



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

Efecto del PH y de la temperatura en el crecimiento de  
bacterias del género Streptococcus aisladas del pozol

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA DE ALIMENTOS**

**P R E S E N T A :**

**CARMEN MARIANA LÓPEZ MUNIVE**



MÉXICO D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2005

m. 348650



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO**



Presidente	<b>Dr. RAUL AGUILAR CABALLERO</b>
Vocal	<b>Dr. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE</b>
Secretario	<b>Dr. GLORIA DIAZ RUIZ</b>
1er sup.	<b>Dr. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ</b>
2do sup.	<b>Dr.FRANCISCO RUIZ TERAN</b>

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 324 del Departamento de Alimentos y Biotecnología en el conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA

SUPERVISOR TÉCNICO

SUSTENTANTE

  
Dr. GLORIA DÍAZ RUIZ

  
Dr. MARIA DEL CARMEN  
WACHER RODARTE

CARMEN MARIANA  
LÓPEZ MUNIVE

## AGRADECIMIENTOS

A la Dr. Gloria Díaz Ruiz por el apoyo otorgado para la elaboración de esta tesis.

A la Dr. Carmen Wachter Rodarte por su confianza y por haberme permitido colaborar con su equipo de trabajo.

A los profesores que integraron el jurado, por su tiempo para la revisión de este trabajo.

A mis compañeros pero más que nada amigos del laboratorio 324: Alicia Rivera, Alejandro Vélez, Sandra Bolaños, Tamara Virgilio y Olivier Luis, por compartir esas largas jornadas de trabajo, hacerlas mucho más amenas y estar siempre para escucharme.

## DEDICATORIAS

Gracias Dios por todo lo ocurrido, sabes que todo lo bueno que haga en esta vida será en honor tuyo.

Ahora es el momento presente, e intento vivirlo como las lecciones de mi pasado y los sueños de mi futuro.

A mis padres Carmen Munive y Jaime López, por sus enseñanzas predicadas a través del ejemplo, por su amor incondicional y por su paciencia, por amarme tal como soy, por impulsarme y por estar para mi siempre que los he necesitado.  
Los amo.

A mi hermana consentida y preferida, Lupita por sus atinados consejos, que aunque a veces duros supieron ubicarme, por su compañía y por la alianza entre nosotras.

A Fillita, gracias por las bendiciones que siempre me has regalado.

A todas esas personitas presentes en mi vida, que me hacen recordar los momentos felices de mi infancia, pero sobre todo por darme tranquilidad y paz: mis sobrinitos y primitos.

A los Munive y a los orgullosamente oaxaqueños López, mi familia de la cual siempre hay algo nuevo que aprender.

A Carolina González, Beatriz Solís, Adriana Martínez y Sergio Burgos, porque a pesar de las circunstancias pero sobre todo de la distancia nuestra amistad ha sobrevivido y es la mejor prueba del cariño que hay entre nosotros.  
Hasta la segunda ronda.

A Miriam Mendoza, Selene López y Gabriela Méndez, por estar conmigo en uno de los momentos de mayor soledad en mi vida y por seguir construyendo una amistad verdadera.

A Miriam García, por ser mi alma gemela, mi cómplice y estar conmigo siempre.

A Maricela Mendoza, Janett García y Brenda Sánchez, mis niñas y amigas QAs consentidas.

A Francisco Avalos, gracias por retarme y por ubicarme en la realidad de las situaciones, por todo lo que aprendimos y compartimos juntos.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	1
<b>CAPITULO 1</b> INTRODUCCIÓN	2
<b>CAPITULO 2</b> ANTECEDENTES	3
2.1 EL POZOL	3
2.2 MICROBIOLOGÍA DEL POZOL	4
2.3 BACTERIAS LÁCTICAS DEL POZOL	4
2.4 BACTERIAS LÁCTICAS AMIOLÍTICAS DEL POZOL	5
2.4 Género <i>Streptococcus</i>	8
2.5 <i>Streptococcus bovis</i>	9
2.6 <i>Streptococcus macedonicus</i>	10
2.7 ASPECTOS GENERALES DEL LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN	12
2.8 ALMIDÓN	14
2.9 AMILASAS	
2.10 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN Y OTROS SUSTRATOS POR BACTERIAS LÁCTICAS AMIOLÍTICAS.	17
<b>CAPITULO III.</b> HIPÓTESIS	19
<b>CAPITULO IV.</b> OBJETIVOS	19
<b>CAPITULO V.</b> METODOLOGÍA	20
5.1 SELECCIÓN DE CEPAS	
a) Activación de las cepas.	20
b) Confirmación de la pureza de las cepas.	20
c) Conservación de cultivos de ambas cepas en glicerol.	20
5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA.	22
a) Reactivación de las cepas.	22

b) Crecimiento de las cepas.	22
c) Preparación de las muestras.	22
d) Prueba de actividad amilolítica.	22
e) Curva estándar de almidón.	24
5.3 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR CEPAS DE <i>S. bovis</i> A12203	25
Y <i>S. macedonicus</i> A45201 A DIFERENTES VALORES DE	
TEMPERATURA Y PH	
a) Reactivación de cepas.	26
b) Preparación del precultivo	26
c) Inoculación	26
d) Fermentación	26
e) Determinación del almidón residual.	27
f) Medición del pH.	27
g) Medición de la actividad amilolítica asociada a las células de <i>S. bovis</i>	27
A1220326 y <i>S. macedonicus</i> A45201	
h) Cuantificación de carbohidratos totales.	27
i) Análisis de azúcares reductores.	27
j) Estimación del crecimiento.	28
• Estimación de la biomasa.	28
• Obtención de los cultivos.	28
• Dilución de las muestras.	28
• Separación y secado de células	29
• Estimación de Parámetros Cinéticos	30
<b>CAPITULO VI.</b>	
<b>RESULTADOS</b>	31
6.1 CONFIRMACIÓN DE PUREZA DE LAS CEPAS	31
6.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA	31
ASOCIADA A LAS CÉLULAS Y EXTRACELULAR.	
6.3 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR <i>S. bovis</i> A12203	32
EFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA	
a) Fermentación a pH 4.5 y 30°C	32
b) Fermentación a pH 6.5 y 30°	32
c) Fermentación a pH 8.5 y 30°C	34

d) Fermentación a pH 6.5 y 37°C	36
e) Fermentación a pH 6.5 y 40°C	38
f) Fermentación a pH 8.5 y 40°C	40
6.4 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR <i>S. macedonicus</i> A45201	45
EFECTO DEL PH Y DE LA TEMPERATURA	
a) Fermentación a pH 4.5 y 40°C	45
b) Fermentación a pH 6.5 y 30°C	45
c) Fermentación a pH 8.5 y 30°C	47
d) Fermentación a pH 6.5 y 37°C	49
e) Fermentación a pH 6.5 y 40°C	51
f) Fermentación a pH 8.5 y 40°C	53
<b>CAPITULO VII.</b>	
DISCUSIÓN	56
7.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA ASOCIADA A LAS CÉLULAS Y EXTRACELULAR	
7.2 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR <i>S. BOVIS</i> A12203	57
INFLUENCIA DEL PH SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA	
7.3 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR <i>S. MACEDONICUS</i> A45201 INFLUENCIA DEL PH Y DE LA TEMPERATURA SOBRE SU CRECIMIENTO Y LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA	63
7.4 COMPARACIÓN DE LAS CEPAS	68
<b>CAPITULO VIII.</b>	
CONCLUSIONES	71
<b>CAPITULO IX.</b>	
REFERENCIAS	72

## RESUMEN

El pozol es una bebida obtenida de la fermentación natural de masa nixtamalizada. La concentración de mono y disacáridos de maíz se reduce notablemente durante la nixtamalización, de este modo el almidón es el principal carbohidrato disponible para el crecimiento de los microorganismos presentes a lo largo de la fermentación y para la producción de ácido láctico.

La fermentación de la masa es llevada a cabo por una extensa microbiota conformada por hongos, levaduras y bacterias. En un estudio previo se aislaron de masa nixtamalizada y fermentada 40 cepas de bacterias lácticas amilolíticas, siendo la especie predominante *Streptococcus bovis*. También se aislaron *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*, lográndose caracterizar la amilasa de *S. bovis* 25124.

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del pH y de la temperatura en el crecimiento y en la producción de amilasas por cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol: *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201, realizando fermentaciones en medio MRS-almidón, bajo diferentes condiciones de pH y de temperatura

Durante el seguimiento de las fermentaciones se monitoreó el crecimiento de las cepas, la actividad amilolítica, los azúcares reductores y totales, así como la hidrólisis del almidón.

Finalmente se calcularon parámetros cinéticos como: la velocidad específica de crecimiento, la velocidad específica de producción de amilasa y el rendimiento de amilasa con respecto a biomasa.

Se determinó que la mayor actividad de las amilasas de ambas cepas se encuentra asociada a la célula y que durante las fermentaciones ninguna de las cepas creció en medios de cultivo con un pH inicial bajo (4.5), pero si lo hicieron en aquellos medios con un pH inicial 6.5 y 8.5 incubadas a 30, 37 y 40 °C.

Los parámetros cinéticos de las fermentaciones indicaron que existen diferencias en el crecimiento en almidón por las cepas de *Streptococcus* evaluadas en este y en un trabajo previo.

## CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

La fermentación es uno de los métodos más antiguos para la preservación de alimentos y es responsable de muchas de las propiedades de los alimentos como el sabor, el aroma, la textura, y la vida de anaquel, también incrementa el valor nutricional del alimento a través de: la biosíntesis de vitaminas, aminoácidos esenciales, el mejoramiento de la calidad proteica, la reducción en el tiempo de cocción, el aumento en la digestibilidad del sustrato, inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos y sus toxinas o la eliminación de texturas y sabores desagradables (Giraffa y col. 2003). Durante la fermentación, los materiales crudos son convertidos por los microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) en productos de calidad alimentaria aceptable.

El pozol es un alimento fermentado en el que interviene una microbiota compleja, sin embargo son las bacterias lácticas el grupo dominante durante toda la fermentación (Nuriada y col. 1995). Mediante métodos tradicionales de cultivo se han aislado especies como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Nuraida y col. 1995). Posteriormente, mediante métodos moleculares, Ampe y col. (1999) determinaron que *S. bovis* se encontró en todas las etapas de fermentación cuando empleó la técnica de DGGE.

Díaz y col. (2003) caracterizaron cuarenta cepas amilolíticas provenientes del pozol. A través métodos moleculares y tradicionales se concluyó que *Streptococcus bovis* fue la cepa dominante. También se identificaron *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

En este trabajo se profundizó en el estudio del crecimiento en almidón de dos cepas del género *Streptococcus*, se determinó si las amilasas de estos microorganismos se encontraban asociadas a la célula o eran extracelulares y también si existen diferencias entre ambas cepas. Para ello se eligieron *Streptococcus bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201.

## CAPITULO II. ANTECEDENTES

### 2.1 EL POZOL

El pozol es una bebida ácida y refrescante de origen maya, es consumido por diversos grupos indígenas y mestizos de los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca Campeche, Yucatán y Quintana Roo (Ulloa y col. 1976-1982).

Para la elaboración de este producto alimenticio se utiliza maíz (blanco, amarillo o negro), el cual es sometido a un proceso de nixtamalización, es decir la cocción de los granos en agua con cal. El maíz nixtamalizado es lavado para eliminar la cal y la cascarilla, posteriormente puede ser sometido a una etapa de remojo durante toda la noche con el objetivo de aumentar la retención de humedad, la siguiente operación es la molienda y la masa obtenida es moldeada para formar bolas (de hasta 1 Kg) que se envuelven en hojas de plátano o bolsas de plástico para evitar la desecación.

Las bolas se dejan fermentar de 1 a 5 días a temperatura ambiente aunque entre los indígenas es más común el consumo de pozol maduro o agrio. La maduración consiste en dejar las bolas de pozol envueltas a temperatura ambiente por 4 días, sin embargo algunas personas lo fermentan hasta por 8 o 9 días y lo consumen cuando ya presenta crecimiento superficial de mohos (Cañas y col. 1993).

Para su consumo la masa es diluida en agua y se bebe a veces adicionada de sal, chile o cacao.

La mayoría de los consumidores (población no indígena) prefieren el pozol que se prepara el mismo día. Este pozol no es muy ácido pero ya presenta cierto grado de fermentación, pues el tiempo que transcurre entre su preparación (envoltura) y consumo (alrededor de 8 horas), es suficiente para que las bacterias lácticas alcancen su desarrollo (Cañas y col. 1993).

Cravioto y col. (1955) observaron que después de la fermentación de la masa, esta tiene mayor contenido de proteína cruda, así como de algunas vitaminas (niacina y riboflavina).

## 2.2 MICROBIOLOGÍA DEL POZOL

La fermentación del pozol es espontánea y es llevada a cabo en estado semisólido con la intervención de una microbiota compleja que se incorpora al nixtamal durante la elaboración del pozol principalmente durante la molienda (Wacher y col. 1993).

Esta microbiota esta conformada por diferentes grupos de bacterias, hongos y levaduras. Algunos hongos que se han identificado en el pozol son *Geotrichum candidum*, *Cladosporium* sp., *Cladosporium cladosporoides* (Ulloa y col. 1987) *Penicillium fellatanum* y *Phoma glomeratta* (Wacher y col. 2000), mientras que se confirmo la presencia de levaduras como *Candida guilliermondii* var. *guilliermondii* (Ulloa y col. 1987), *Kluyveromices lactis* var. *lactis*, *Debariomyces hanseii*, *Rhodothorula mucilaginosa* y *Rhodothorula minuta* (Wacher y col. 2000).

Además se han detectado bacterias como *Bacillus minumum* (Ben Omar y Ampe, 2000), *Bacillus subtilis* (Ampe y col. 1999), *Bacillus cereus* y *Bacillus lentus* (Rivera, 2001) entre otros, así como diversos serotipos de *E. coli* (Sainz y col. 2001).

Sin embargo, son las bacterias lácticas las que predominan desde en el inicio de la fermentación de las masas y las encargadas de acidificar el producto (Wacher y col. 1993).

## 2.3 BACTERIAS LÁCTICAS DEL POZOL

Las bacterias lácticas constituyen un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista taxonómico. Tienen como característica común la de producir ácido láctico como catabolito único o mayoritario (más de la mitad en la fermentación de los azúcares). Los miembros más característicos son cocos o bacilos Gram positivos, inmóviles y catalasa negativos (Parés y Juárez, 1997).

En la fermentación del pozol las bacterias lácticas son el grupo dominante durante todo el proceso y mediante métodos tradicionales de cultivo se han determinado especies como

*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus confusus*, *Lactococcus lactis* y *Lactococcus raffinolactis* (Nuriada y col. 1995).

A través de la secuencia de una biblioteca de clonas de una región del gen ribosomal 16S, se identificó y confirmó la presencia de *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus alimentarium* y *Lactobacillus delbrueckii* (Escalante y col. 2001).

## 2.4 BACTERIAS LÁCTICAS AMIOLÍTICAS DEL POZOL

En el estudio de Díaz y col. (2003) se demostró que el 40% de las bacterias lácticas presentes en la masa inicialmente son amilolíticas y disminuyen hasta 3% después de 72 horas de fermentación (Tabla 1).

**Tabla 1. Concentración de bacterias lácticas amilolíticas, bacterias lácticas y valores de pH durante la fermentación del pozol a 30°C (Díaz y col. 2003).**

Tiempo de fermentación (horas)	Valores de pH	Concentración de bacterias lácticas amilolíticas log ufc (g peso seco) <sup>-1</sup>	Concentración de bacterias ácido lácticas log ufc (g peso seco) <sup>-1</sup>
0	7.4	4.5	4.9
6	5.9	4.6	8.2
24	4.8	8.4	9.9
48	4.8	8.7	10.4
72	4.4	8.7	10.2

La alta concentración de bacterias lácticas amilolíticas (BLA) sugiere su importancia durante la fermentación del pozol, principalmente durante las primeras 24 horas, esto indica que las condiciones alcalinas del medio (valores de 7.4 aproximadamente) propician la presencia de bacterias con actividad amilolítica. Sin embargo, el número de bacterias lácticas no amilolíticas es alto al final de la fermentación. Esto puede ser debido al uso eficiente de mono y disacáridos inicialmente presentes y de otros azúcares provenientes de la hidrólisis de almidón por las bacterias lácticas amilolíticas.

Asimismo la presencia de BLA desde el inicio de la fermentación puede explicar la diversidad de población microbiana y su importancia en cada etapa del proceso.

Para entender el papel de las bacterias lácticas amilolíticas en la fermentación de este alimento se determinó su diversidad en este mismo estudio. Se caracterizaron cuarenta cepas amilolíticas a través métodos moleculares y tradicionales.

Mediante un estudio de ribotipificación (en dos muestras de pozol) se pudieron distinguir dos clusters y dos líneas. El cluster 1a incluye 22 cepas (19 de la muestra A y 3 de la muestra B) que sugieren un similitud del 54%. El cluster 1b incluye una cepa de la muestra A y 13 de la muestra B que sugieren un 54% de similitud. Una línea incluye una cepa de la muestra B que sugiere un 32% de similitud. Dos cepas de la muestra B sugieren un nivel de similitud de 10% (Figura 1).

Se identificaron cepas representativas mediante la comparación de secuencias del gen rRNA 16S. Las cepas 15430, 25124, A56203 y A57103 del grupo 1a y las cepas A57206 y A12203, del grupo 1b mostraron una similitud alta (99 a 100%) con *Streptococcus bovis* y con *Streptococcus infantarius* ssp. coli.

La cepa A45201 (una línea entre el cluster 1b y 2) muestra 100% de similitud con *Streptococcus macedonicus*, la cepa A45212 (grupo 2) un 99% de similitud con *Lactococcus lactis* y finalmente la cepa A36202 muestra un 98% de similitud con *Enterococcus sulfureus*. *Streptococcus bovis* fue la cepa dominante.

De las cepas de *Streptococcus* que han sido aisladas solamente se ha caracterizado la amilasa de *S. bovis* A25124, sin embargo es necesario determinar si amilasas de cepas de ribotipos diferentes tienen características diferentes.

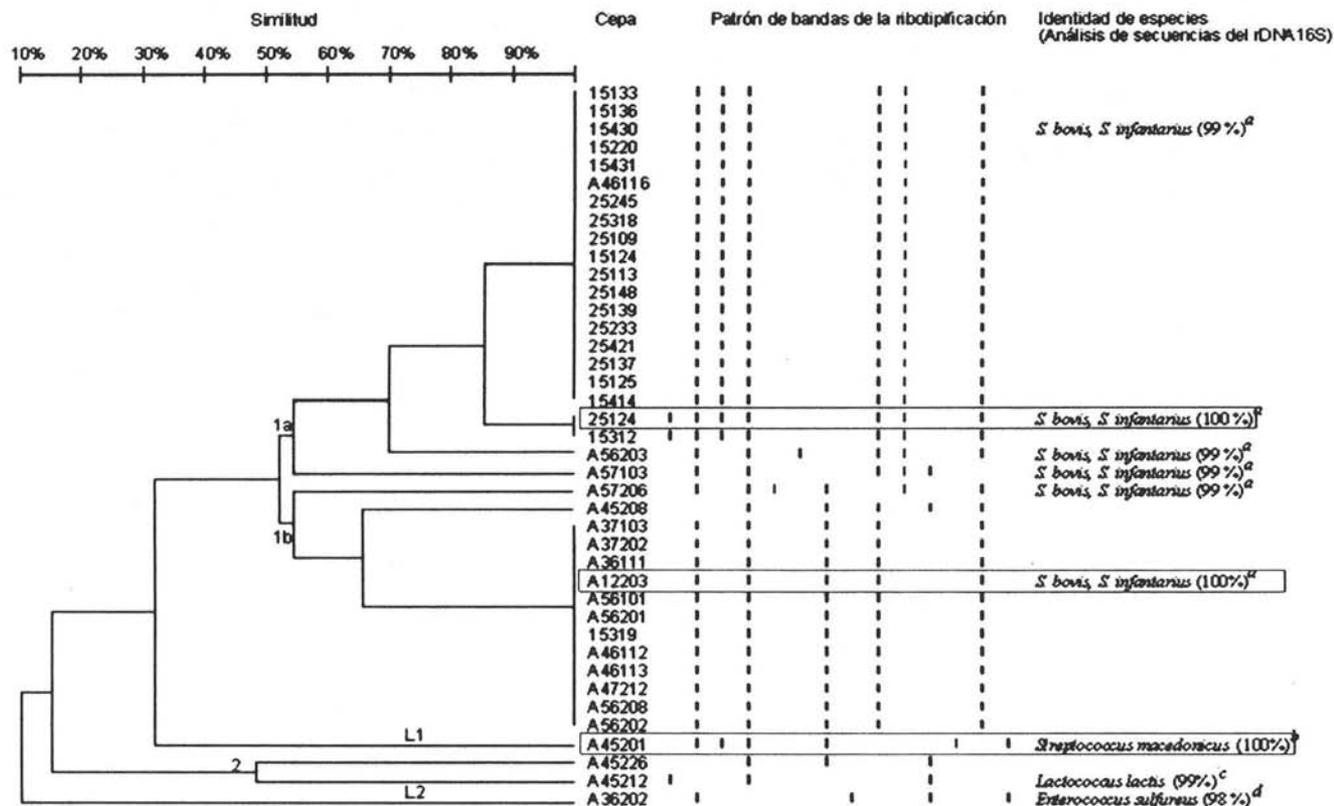


Figura 1. Dendrograma de 40 cepas de bacterias lácticas con actividad amilolítica. Las identificaciones de "a", "b" y "c" se basaron en comparaciones con la secuencia del gen rRNA 16S de una secuencia parcial (correspondiente a las posiciones 30 - 338 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) y la identificación de "d" se basó en la secuencia casi completa (correspondiente a las posiciones 30 - 1521 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*). En paréntesis se indican los porcentajes de similitud de las identificaciones por comparación de secuencias del gen rRNA 16S (Diaz y col. 2003). En los recuadros se señalan las cepas que se caracterizaron durante este estudio: *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201.

## 2.4 Género *Streptococcus*

### Clasificación

Inicialmente el género fue descrito en 1884, su clasificación y nomenclatura han sido sometidas a numerosas modificaciones a lo largo de los años. A través del uso de diversas técnicas se estableció la división del género en diversos grupos (Hardie y col. 1986).

Basándose en el análisis de las secuencias del gen rRNA 16S, hibridaciones de DNA-rRNA y estudios serológicos, los estreptococos fueron subdivididos en tres géneros: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* y *Lactococcus*.

Los estudios filogenéticos más recientes, basados en la comparación de las secuencias del gen rRNA 16S, confirmaron la presencia de de diferentes grupos dentro del género *Streptococcus*: *anginosus*, *bovis*, *mitis*, “piogénico”, *mutans* y *salivarius* (Hardie y Whiley, 1995).

### Características generales

El género *Streptococcus* consiste de células Gram positivas, esféricas u ovoides que típicamente se agrupan en cadenas o pares, son anaerobios facultativos, sin embargo algunos requieren de CO<sub>2</sub> para crecer y algunos otros pueden ser anaerobios estrictos.

Son quimiorganótrofos que poseen un metabolismo fermentativo, mediante el cual producen principalmente ácido láctico a partir de la fermentación de carbohidratos. Sus requerimientos nutricionales son complejos y variables.

La temperatura óptima de crecimiento es usualmente 37°C, pero las temperaturas máximas y mínimas varían entre especies (Hardie y col. 1986).

Algunos estreptococos son de gran importancia en la industria láctea pero también se ha establecido una relación entre los estreptococos y una gran variedad de enfermedades en el

hombre y algunos animales, muchas de las especies conocidas son parásitos y otros son importantes patógenos (Tsakalidou y col. 1998).

### **2.5 *Streptococcus bovis***

Es una bacteria láctica frecuentemente aislada del tracto digestivo de ganado, de otros rumiantes y del colon de humanos.

Durante los años 80s, muchos estreptococos fueron reagrupados en otros géneros (por ejemplo *Lactococcus* y *Enterococcus*) basados en el análisis de la secuencia del gen rRNA 16S, homología de ADN y características de la pared celular. *S. bovis* y *S. equinus* no fueron reclasificados, pero se encuentran dentro de un grupo altamente heterogéneo del género *Streptococcus* (Jarvis y col. 2001).

Las células de *S. bovis* son esféricas u ovoides, tienen de 0.8-1.0  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran en cadenas o pares, son Gram positivas, catalasa negativas.

Esta especie comprende cepas con propiedades heterogéneas que incluyen cepas anaeróbicas capaces de crecer en caldos a pH de 9.6 o con 6.5 % de NaCl, incapaces de crecer por arriba de 45 °C y por debajo de 22°C (Hardie y col. 1986).

Hungate y col. (1997) notaron un descenso en las cuentas de este microorganismo cuando fue expuesto a un ambiente ácido (pH 5.6).

Un estudio con cepas de *S. bovis* aisladas del rumen reveló que este microorganismo tiene requerimientos nutricionales simples, crece adecuadamente en el rumen cuando carbohidratos como el almidón u otros azúcares se encuentran en abundancia, puede cambiar su fermentación de lactato a acetato, formato y etanol para obtener más ATP (Jarvis y col. 2001).

Estas cepas crecieron rápidamente en glucosa ( $1.71 \text{ hr}^{-1}$ ) y en el mismo sustrato otras cepas como la JB1 mostraron una velocidad máxima de crecimiento de hasta  $2 \text{ hr}^{-1}$ , pero solo si los cultivos son sembrados cada 12 horas (Jarvis y col. 2001), también mostró velocidades de crecimiento similares en almidón ( $1.98 \text{ hr}^{-1}$ ).

*S. bovis* 25124 (una cepa aislada del pozol), presentó una velocidad específica de crecimiento en almidón de  $0.94 \text{ hr}^{-1}$  durante una fermentación a  $30^\circ\text{C}$  (Díaz y col. 2003).

## 2.6 *Streptococcus macedonicus*

Durante un estudio de la diversidad de bacterias lácticas presentes en la fermentación natural de un queso griego (Kasseri), se aislaron cepas de estreptococos que inicialmente fueron designadas como *Streptococcus thermophilus*, sin embargo un análisis completo de las proteínas totales mediante SDS-PAGE reveló que las cepas eran completamente diferentes a las reportadas previamente. El estudio de las secuencias del rRNA 16S y 26S mostró que estas cepas representaban una especie perteneciente al género *Streptococcus*, el cual fue nombrado *Streptococcus macedonicus* (Tsalikalidou y col. 1998).

*Streptococcus macedonicus* es un microorganismo Gram positivo, catalasa negativo, que típicamente se agrupa en pares o en pequeños grupos. El crecimiento en caldo M17 (Oxoid) a  $40$  y  $37^\circ\text{C}$  es muy similar y definitivamente mejor que a  $30^\circ\text{C}$ . Solo después de 24 horas se observó un ligero crecimiento cuando la cepa fue incubada a  $25^\circ\text{C}$  y es nulo cuando se inocula en caldo con  $6.5\%$  de NaCl.

Se planteó una relación cercana entre *S. macedonicus* y *S. thermophilus* debido a sus características fenotípicas, sin embargo pueden ser diferenciados fácilmente por sus características de crecimiento y su actividad bioquímica, así como la producción de ácido a partir de N- acetilglucosamina, celobiosa y maltosa, además de la reacción negativa para  $\beta$ -galactosidasa.

*S. macedonicus* es incapaz de producir reacciones de oscurecimiento en un medio con esculina, esta puede ser una prueba determinante para diferenciarlo de otros microorganismos que son filogenéticamente cercanos tal como *S. bovis*, *S. equinus* y *S. alactolyticus*.

Además puede distinguirse de los enterococos por su nula resistencia a la bilis,  $\beta$ -glucosidasa negativa y su incapacidad para producir ácido a partir de gentobiosa, ya que todas las especies conocidas de enterococos dan resultados positivos con estas pruebas (Tsakalidou y col 1998).

Se reconoce a *S. macedonicus* 136 como un microorganismo capaz de crecer a temperaturas de mesófilos y de termófilos, y también como un productor de exopolisacárido (EPS) en fermentaciones con agitación (60 rpm) en un medio con leche descremada al 10% y adicionado de una mezcla de aminoácidos en cantidades similares a las encontradas en el medio proteosa peptona al 1% y a una temperatura de incubación de 30°C, a pH inicial controlado de 5.5.

Un análisis posterior de EPS producido por esta cepa demostró que está compuesto principalmente por glucosa, galactosa, y N-acetilglucosamina (Vincent y col. 2000).

El papel del EPS no está claramente definido, pero puede proteger a la célula cuando las condiciones ambientales son desfavorables y propician una situación de estrés (Zisu y col. 2003).

La cantidad y la composición de EPS producido por bacterias lácticas está determinado por la composición del medio de cultivo (en términos de fuente de carbono, nitrógeno y contenido de vitaminas y minerales) y por las condiciones de fermentación (pH del medio, temperatura de incubación, etc.) (Zisu y col. 2003).

El efecto de la temperatura y del pH del medio de crecimiento sobre la producción de EPS es muy variable y también depende de la cepa usada. Por ejemplo, algunos investigadores han encontrado que la producción de EPS es óptima a bajas temperaturas, mientras que otros han mostrado que la producción del exopolisacárido es favorecida a altas temperaturas. El pH óptimo para la producción de EPS generalmente se encuentra en un rango de 5 a 7 (De Vuyust y col. 1998).

En la industria, el EPS producido por bacterias lácticas es usado para mejorar la textura de alimentos fermentados como el yogurt o el queso (Jolly y col. 2001).

## 2.7 ASPECTOS GENERALES DEL LOS PROCESOS DE FERMENTACIÓN

Un proceso de fermentación es aquél mediante el cual determinados sustratos que componen el medio de cultivo son transformados por acción microbiana en metabolitos y biomasa.

Durante el transcurso de la fermentación el microorganismo va aumentando en su concentración, al mismo tiempo el medio se va modificando y se forman nuevos productos como consecuencia de las actividades catabólicas y anabólicas.

### Efectores internos y externos

El comportamiento de un microorganismo en crecimiento, es el resultado de la interacción que se produce entre el microorganismo y el medio ambiente en el fermentador poniéndose de manifiesto los llamados efectores internos y externos (Figura 2).

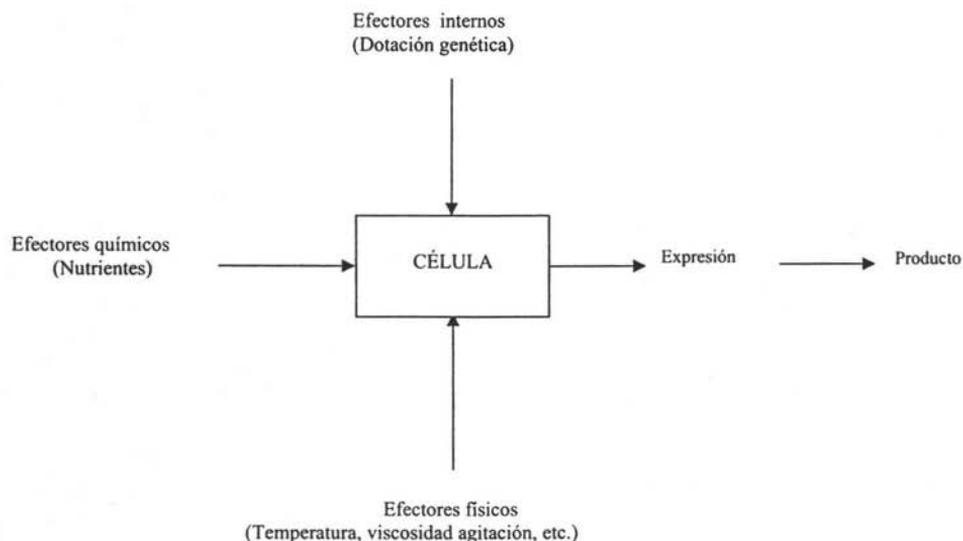


Figura 2. Influencia de los efectores internos y externos sobre la expresión celular (Parres 1997).

Los efectores internos se refieren a la dotación genética intrínseca del microorganismo y a sus mecanismos de regulación metabólica, que pueden ser modificados por alteraciones del medio ambiente.

Estos efectores pueden modificarse para lograr la optimización de un proceso fermentativo, es decir con el objeto de mejorar la productividad de un proceso fermentativo. Las cepas empleadas pueden someterse a un proceso de mutación que al alterar algún sector del genoma logran aumentar la producción de un metabolito aunque también pueden disminuirla o en el caso contrario, suprimirla.

La respuesta del microorganismo al medio ambiente o la expresión fenotípica de este, es el resultado de la influencia de variables de naturaleza física y química que constituyen los efectores externos.

Los efectores externos de naturaleza física están vinculados con las condiciones de operación que se utilizan en los fermentadores y son por ejemplo: la temperatura, la agitación, la aireación, etc. Es decir están constituidos por las variables de manipulación física, mientras que los de naturaleza química están representados por la presencia de los componentes del medio de fermentación.

La modificación de efectores como la temperatura tiene un efecto notable sobre el proceso. Si la temperatura no es la adecuada puede disminuir o impedir la formación de un metabolito, puede modificar los requerimientos nutritivos de algunos microorganismos, influye en los índices de las reacciones químicas y en la configuración tridimensional de las proteínas, con lo cual se afectan los índices de actividad enzimática. Los diferentes grupos microbianos presentan exigencias diferentes respecto a la temperatura que permite su crecimiento. La temperatura óptima, mínima y máxima de crecimiento de una especie microbiana esta relacionada con la temperatura del hábitat normal del microorganismo.

Por otro lado, los microorganismos varían en sus rangos de tolerancia al pH, pero en general requieren una concentración de iones hidrogeno para su crecimiento.

El efecto del pH sobre los índices de crecimiento microbiano se basa en gran parte en la naturaleza de las proteínas, pues la interacción entre los grupos R de los aminoácidos influye mucho en la estructura y función de las proteínas.

## 2.8 ALMIDÓN

Es el sustrato principal de las bacterias amilolíticas y químicamente es una mezcla de dos polisacáridos, la amilosa y la amilopectina; el primero es el producto de la condensación de D-glucopiranosas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1,4), que establece largas cadenas lineales con 200-2500 unidades, cuya unidad repetitiva es la  $\alpha$ - maltosa. Adquiere una conformación tridimensional helicoidal, en la que cada vuelta de la hélice consta de seis moléculas de glucosa (Badui 1993).

La amilopectina se diferencia de la amilosa en que contiene ramificaciones que se encuentran unidas por enlaces  $\alpha$ -D-(1,6), localizadas cada 15-25 unidades lineales de glucosa.

Después de la celulosa es probablemente el polisacárido más abundante e importante desde el punto de vista comercial. Se encuentra en cereales, tubérculos y en algunas frutas como polisacárido de reserva de energética (Badui, 1993).

En el maíz el almidón es el principal carbohidrato (72-73%), ya que la sacarosa, glucosa y fructosa representan del 1 al 3% en el grano (Boyer y Shannon, 1987).

## 2.9 AMILASAS

Estas enzimas tienen gran importancia biotecnológica ya que hoy en día sus usos se extienden en la industria alimentaria, textil y papelera. Proviene de diferentes fuentes como plantas, animales y microorganismos, siendo estas últimas las más utilizadas en la industria (Pandey y col. 2000).

Las amilasas son capaces de hidrolizar moléculas de almidón y así obtener diversos productos como dextrinas y progresivamente polímeros más pequeños compuestos de unidades de glucosa (Fogarty y col. 1983).

Las amilasas pueden dividirse en 2 categorías, endoamilasas y exoamilasas. Las primeras hidrolizan aleatoriamente el interior de la molécula de almidón, esta acción causa la formación de oligosacaridos de diferentes longitudes, lineales y ramificados. Las exoamilasas hidrolizan a partir del extremo no reductor generando residuos pequeños.

Una segunda clasificación propone dividir las en:  $\alpha$  y  $\beta$ -amilasas (Gupta y col. 2003). La  $\alpha$ -amilasa es una endohidrolasa que actúa de manera aleatoria sobre los enlaces internos  $\alpha$ -1, 4 de la amilosa y de la amilopectina, con lo cual se producen dextrinas.

Por su parte,  $\beta$ -amilasa hidroliza los enlaces  $\alpha$ -1, 4, a partir de los extremos no reductores y produce moléculas de maltosa; esta actividad la clasifica como una exoenzima (Badui, 1993).

#### **Producción microbiana de $\alpha$ -amilasa.**

La producción microbiana de  $\alpha$ -amilasa es afectada por una gran variedad de factores fisicoquímicos. Entre los más notables se encuentran la composición del medio de crecimiento, el pH del medio, la concentración de fosfatos, el inóculo, la temperatura, la aireación, la fuente de carbono y la fuente de nitrógeno. De estos parámetros, la temperatura y el pH juegan un papel muy importante en los cambios morfológicos del microorganismo y en la secreción de la enzima.

El cambio de pH observado durante el crecimiento de los microorganismos afecta de manera muy importante la producción de la enzima pues induce cambios morfológicos en el microorganismo y en la producción de la enzima. La influencia de la temperatura sobre la producción de amilasa está relacionada con el crecimiento del microorganismo (Gupta y col. 2003).

## **Bacterias lácticas y sus amilasas.**

Existen diversos alimentos fermentados de los cuales se han aislado bacterias lácticas amilolíticas y se han caracterizado las amilasas que producen, a continuación se presentan algunos ejemplos de las cepas que las producen y las condiciones en las que se observa la mayor actividad amilolítica.

Se han reportado cepas de *Streptococcus bovis* aisladas del rumen que producen amilasas intra y extracelulares, tal es el caso de la cepa JB1 y 148, esta última muestra la mayor actividad de su amilasa intracelular a pH 6.5 y 40°C, mientras que la extracelular a pH 5.5 y 50 °C (Satoh y col. 1997).

La mayor actividad de la amilasa L137, producida por *Lactobacillus plantarum* se reportó cuando esta se encuentra a valores de pH de 3.4 a 35°C, mientras que la amilasa extracelular de *Lactobacillus plantarum* A6 tiene su mayor actividad a pH 5 y a una temperatura de 65°C (Giraud y col 1997; Rodríguez-Sanoja y col. 2000).

Durante la caracterización de la  $\alpha$ -amilasa extracelular de *Lactobacillus manihotivorans* LMG se determinó que el pH y la temperatura de mayor actividad fueron 5.5 y 55°C respectivamente (Aguilar y col. 2000).

La  $\alpha$ -amilasa de *Lactobacillus amylovorus* tiene su mayor actividad a pH 5 y 62°C (Olympia y col. 1995).

La actividad de las bacterias lácticas más amilolíticas aisladas del pozol se encuentra asociada a la célula, ya que no se encontró actividad de la enzima en el sobrenadante del medio en el que fueron cultivadas (MRS-almidón), sin embargo si se encontró actividad amilolítica asociada a la célula, tal es el caso de *Streptococcus bovis* 25124, *Enterococcus sulfureus* A36202 y *Lactococcus lactis* A45212.

La mayor actividad de las amilasas producidas por *Lactococcus lactis* A45212 y *Streptococcus bovis* 25124 se presentó a valores de pH cercanos a la neutralidad (6-6.6) y son estables en condiciones de pH alto e inestables a valores de pH bajo.

Estas mismas cepas mostraron la mayor actividad amilolítica en un rango de temperatura de 30 a 37°C, lo que coincide con las condiciones de incubación del pozol en Villahermosa Tabasco.

La amilasa de *Streptococcus bovis* 25124 y *Lactococcus lactis* A45212 produjeron desde glucosa hasta maltooctaosa y maltodextrinas. La maltosa, maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa fueron los productos principales de la hidrólisis del almidón por la amilasa de *Lactococcus lactis* A45212. *Streptococcus bovis* 25124 produjo maltotetraosa, maltopentaosa y maltohexaosa (Díaz y col.2003).

## **2.10 Fermentación del almidón y otros sustratos por bacterias lácticas amilolíticas.**

Mediante la fermentación de diversos sustratos y en condiciones controladas, se han elucidado ciertas dinámicas de crecimiento, sobrevivencia y actividad bioquímica de las bacterias lácticas amilolíticas que intervienen en la fermentación de alimentos.

A continuación se muestran datos obtenidos de las cinéticas de fermentaciones en almidón u otros sustratos por bacterias lácticas amilolíticas.

Se han estudiado las fermentaciones de cepas de *Streptococcus bovis* aisladas del tracto digestivo de rumiantes. *S. bovis* JB1 mostró un crecimiento rápido cuando se llevó a cabo una fermentación en almidón a 39°C, la velocidad específica máxima de crecimiento reportada fue de 1.62 hr<sup>-1</sup>, los productos principales de la hidrólisis de almidón fueron maltosa, maltotriosa y maltotetraosa, los cuales se acumularon durante el crecimiento (Cotta y col. 1991).

En otro estudio (Bond y col. 1998) donde se evaluó el crecimiento de veinte cepas de *S. bovis* a 37°C y a pH 6.7 usando diferentes sustratos, el crecimiento fue más lento sobre lactosa (1.21 hr<sup>-1</sup>) que sobre glucosa (1.67 hr<sup>-1</sup>).

Como se ha mencionado anteriormente, el pH es un factor determinante para el desarrollo de un microorganismo, dos ejemplos claros son las fermentaciones en almidón a pH controlado y no controlado de *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup> y *L. plantarum* A6

*L. plantarum* A6 creció e hidrolizó el almidón eficientemente hasta valores de pH de 4.5. A pH controlado (6), se observó un aumento en la producción de ácido láctico, de amilasa y de biomasa para *Lactobacillus manihotivorans*, pero *L. Plantarum* A6 solo aumento su producción de amilasa. La velocidad específica de crecimiento fue la misma en glucosa y en almidón para *Lactobacillus manihotivorans* (0.35 hr<sup>-1</sup>) (Guyot y col. 2000).

En otro estudio, se determinaron las condiciones óptimas de crecimiento en el medio MRS-almidón de *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 y se observó que el pH óptimo de crecimiento era de 6.6 a 30°C. Además se observó que esta bacteria presentó un patrón bifásico de crecimiento: una primera fase exponencial de las 0 a las 5 horas y otra de las 5.5 a las 8 horas (la velocidad específica máxima de crecimiento fue de 0.38 y 0.35 hr<sup>-1</sup>, respectivamente). Este comportamiento puede deberse a la composición del medio o al agotamiento de algunos factores de crecimiento (Calderón y col. 2001).

Estos microorganismos han sido aislados de diferentes entornos y áreas geográficas y han sido ampliamente estudiados; sin embargo, algunos aun no se han estudiado a fondo, tal es el caso de bacterias del género *Streptococcus* aislados del pozol.

### CAPITULO III. HIPÓTESIS

Existen diferencias en el crecimiento y producción de la amilasa de las cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol, bajo diferentes condiciones de temperatura y de pH inicial del medio.

### CAPITULO IV. OBJETIVOS

#### OBJETIVO GENERAL

Determinar el pH y la temperatura óptimos para la producción de la amilasa y el crecimiento de dos cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol.

#### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar si las amilasas de dos cepas de *Streptococcus* se encuentran asociadas a la célula o son extracelulares.
2. Evaluar diferentes temperaturas de incubación con el fin de determinar la mejor temperatura para crecimiento y la mayor producción de amilasa de dos cepas de *Streptococcus*.
3. Establecer el pH para el mayor crecimiento y la más alta producción de amilasa de dos cepas de *Streptococcus*.
4. Comparar los datos de las cinéticas de fermentación en almidón de las diferentes condiciones de pH y de temperatura evaluadas e indicar las diferencias entre ambas cepas.
5. Evaluar si existen diferencias de ambas cepas, con otra anteriormente estudiada (*Streptococcus bovis* 25124) a través de la comparación de algunos parámetros cinéticos obtenidos de la fermentación del almidón.

## CAPITULO V. METODOLOGÍA

### 5.1 SELECCIÓN DE CEPAS

Para la realización de este trabajo se eligieron dos cepas: *Streptococcus bovis* A12203 y *Streptococcus macedonicus* A45201, aisladas en un estudio previo donde se determinó que el género *Streptococcus* era el predominante entre las bacterias lácticas amilolíticas del pozol (Díaz y col. 2003).

#### a) Activación de las cepas.

A partir de cultivos puros conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  en perlas de vidrio y glicerol al 20% se activaron las cepas seleccionadas tomando una perla para depositarla en un tubo con 5 mL de caldo MRS- glucosa (Oxoid) e incubarlo por 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ .

#### b) Confirmación de la pureza de las cepas.

Las cepas que se activaron en caldo MRS-glucosa se inocularon en cajas Petri con agar MRS-almidón (ver Tabla 2) y se incubaron durante 24 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ .

Se determinó la actividad amilolítica de las cepas al observar los halos de hidrólisis en el medio con almidón. Se verificó la homogeneidad en la morfología de las colonias y de las células cuando se observaron al microscopio después de realizar una tinción de Gram. Por último se realizó la prueba de la catalasa.

#### c) Conservación de cultivos de ambas cepas en glicerol.

Las cepas que se activaron en caldo MRS-glucosa se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  en tubos de plástico que contenían 0.75 mL de glicerol al 80% y 0.75 mL del cultivo. Estos cultivos se utilizaron en experimentos posteriores

**Tabla 2. Composición del medio MRS-Almidón.**

MEDIO MRS-Almidón	
Reactivos	g / L
peptona pancreática de caseína	10
extracto de carne	10
extracto de levadura	5
almidón soluble de papa	20
citrato diamoniacal	2.17
acetato de sodio	5
sulfato de magnesio heptahidratado	0.207
sulfato de manganeso monohidratado	0.056
fosfato dipotásico	2.62
agar bacteriológico (para medio sólido)	15

## **5.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMIOLÍTICA.**

### **a) Reactivación de las cepas.**

Se tomaron 0.5 mL de los cultivos congelados y se inocularon en viales con 5 mL de caldo MRS-glucosa. Se incubaron a 30°C por 16 horas.

### **b) Crecimiento de las cepas.**

Se inocularon 2 mL de los cultivos reactivados previamente en tubos de centrifuga con 20 mL de medio MRS-almidón y se incubaron por 16 horas a 30°C.

### **c) Preparación de las muestras.**

Los cultivos se centrifugaron a 15000 rpm y 4°C durante 15 minutos, se separo el sobrenadante y se conservó en congelación. Las células se lavaron adicionándoles 20 mL de agua destilada estéril, se agitaron para resuspenderlas, se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones y se eliminó el agua de lavado. Esta operación se repitió una vez más y finalmente las células se resuspendieron en 2 mL de agua estéril y se conservaron a 20°C.

### **d) Prueba de actividad amilolítica.**

La medición de la actividad amilolítica se hizo en el sobrenadante para determinar la actividad extracelular y en las células para determinar la actividad asociada a la célula.

La actividad amilolítica se evaluó utilizando el método de extinción del complejo almidón-yodo, que se basa en la propiedad del almidón soluble de formar un complejo café en presencia del reactivo yodo-yoduro al 4% y que absorbe a 620 nm. Por acción de la amilasa disminuye el color producido por el complejo almidón-yodo (Giraud y col. 1993).

### ▲ Reacción enzimática

Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra (sobrenadante o las células) para adicionarlo a un tubo de ensayo colocado previamente en un baño de agua a  $30^{\circ}\text{C}$  y con 800  $\mu\text{L}$  de una solución amortiguada (con buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 6.6) de almidón (Prolabo) 7 g/L. Después de 10 minutos la reacción se detuvo adicionando 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 2N y pasando el tubo a un baño de hielo-agua.

Los blancos se prepararon en tubos de ensayo que fueron colocados anticipadamente en un baño de hielo-agua y a los cuales les fueron añadidos en estricto orden: 100  $\mu\text{L}$  de ácido sulfúrico 2N, 800  $\mu\text{L}$  de la misma solución amortiguada de almidón y 100  $\mu\text{L}$  de la muestra.

### ▲ Determinación del almidón residual.

Para determinar el almidón que no fue hidrolizado durante la prueba enzimática se agregaron en un tubo de ensayo 0.1 mL de la muestra y 2.4 mL de solución yodo-yoduro al 4% y se agitó. Se leyeron los valores de absorbancia a 620nm en un espectrofotómetro 21D Milton Roy y se relacionaron con una curva patrón de almidón (Figura 3).

Para calcular la actividad amilolítica se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad amilolítica (U/mL)} = (\text{Abs}_{\text{blanco}} - \text{Abs}_{\text{muestra}}) * \frac{1}{P} * 3 \dots\dots(1)$$

Donde:

P = pendiente de la curva estándar de almidón (absorbancia a 620nm vs. concentración de almidón en g/L).

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 10 mg de almidón en 30 minutos.

e) Curva estándar de almidón.

La curva de calibración se construyó con los datos de absorbancia a 620nm que se obtuvieron al determinar el complejo almidón-yodo (tal como se describió previamente) en soluciones de almidón (Prolabo) a diferentes concentraciones (Tabla 3). La figura 3 muestra la curva estándar obtenida.

Tabla 3. Concentraciones de almidón utilizadas para la obtención de la curva estandar

TUBO	mL de sol. Stock ( almidón Prolabo 7 g/L)	mL de agua destilada	Almidón Prolabo (g/L)
blanco	0	1.0	0
1	0.2	0.8	1.4
2	0.4	0.6	2.8
3	0.6	0.4	4.2
4	0.8	0.2	5.6
5	1.0	0	7.0

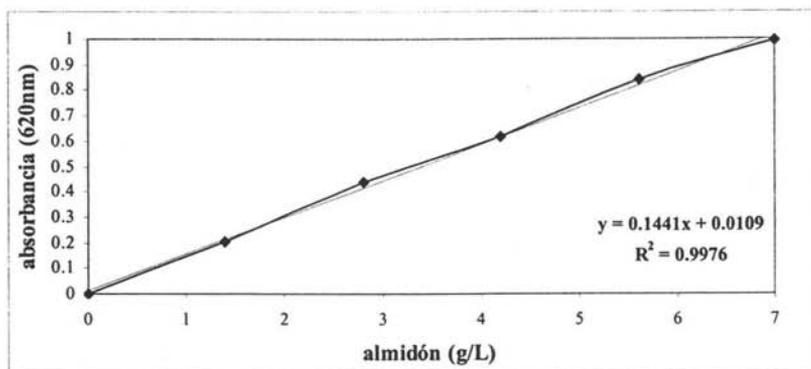


Figura 3. Curva de calibración de almidón (Prolabo). Método de extinción del complejo almidón-yodo.

### 5.3 Fermentación del almidón por cepas de *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201 a diferentes valores de temperatura y pH

Para evaluar el efecto del pH y la temperatura en el crecimiento y en la producción de amilasa de *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201 se evaluaron algunos parámetros durante fermentaciones en medio MRS-almidón bajo diferentes condiciones de temperatura de incubación y pH inicial del medio de cultivo (Tabla 4).

**Tabla 4.** Condiciones de temperatura y de pH para las diferentes fermentaciones del almidón por *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201, así como los parámetros evaluados durante éstas.

Fermentación	Temperatura de incubación	pH inicial del medio de cultivo	Parámetros evaluados en las fermentaciones
1	30°C	4.5	❖ Producción de biomasa
2	30°C	6.5	❖ Actividad amilolítica
3	30°C	8.5	❖ pH
4	37°C	6.5	❖ Almidón residual
5	37°C	8.5	❖ Carbohidratos totales
6	40°C	8.5	❖ Azúcares reductores

**a) Reactivación de cepas.**

La reactivación de los cultivos congelados de *Streptococcus* se hizo inoculando 1 mL de estas cepas en 10 mL de caldo MRS-glucosa, se incubaron a 30°C por 24 horas.

**b) Preparación del precultivo.**

Se tomaron 8 mL de los cultivos de la cepa reactivada y se inocularon en 80 mL de caldo MRS-almidón, estos medios se incubaron a 30°C por 16 horas.

**c) Inoculación**

Los 80 mL del precultivo se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 1 L con 800 mL de medio MRS-almidón ajustado al pH requerido (el pH normal del medio MRS almidón es de 6.5, pero se ajustó a 8.5 y 4.5 con NaOH 2N y ácido acético 2.5N respectivamente).

**d) Fermentación.**

El medio inoculado se incubó 26 horas y sin agitación a la temperatura a la cual se pretendía evaluar las cepas. Todas las fermentaciones se hicieron por duplicado.

Se tomaron muestras de 20 mL cada hora desde el inicio y hasta las 12 horas de fermentación y también se tomó una última muestra a las 26 horas.

Inmediatamente después de tomar las muestras, se centrifugaron a 15000 rpm, 15 minutos a 4°C, de los sobrenadantes se tomó una alícuota para determinar el almidón residual y el resto se congeló para un posterior análisis de carbohidratos. Las células se lavaron 2 veces (el mismo día) como se describió anteriormente (inciso d, preparación de las muestras) y ya limpias se resuspendieron en 2 mL de agua destilada estéril. Estas células se conservaron a -20°C para después evaluar la actividad amilolítica.

**e) Determinación del almidón residual.**

Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L del sobrenadante de los cultivos y se hicieron las diluciones adecuadas para determinar el almidón residual presente en la muestra a través del método de extinción del complejo almidón –yodo, tal como se explicó previamente.

**f) Medición del pH.**

La medición de pH se hizo cada 3 horas a lo largo de la fermentación tomando una muestra del medio fermentado para medirlo en un potenciómetro (Jenway 3020).

**g) Medición de la actividad amilolítica asociada a las células de *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201.**

La actividad amilolítica asociada a las células se midió siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (determinación de la actividad amilolítica)

**h) Cuantificación de carbohidratos totales.**

La cuantificación de carbohidratos totales en las muestras obtenidas de las fermentaciones se llevó a cabo por el método descrito por Dubois (1956) y modificado por Strickland (1968).

**i) Análisis de azúcares reductores.**

La cuantificación de azúcares reductores se hizo siguiendo el método de Miller (1959).

## **j) Estimación del crecimiento.**

### **1. Estimación de la biomasa.**

La biomasa se determinó relacionando los datos de densidad óptica, medida a 600 nm en un espectrofotómetro 21D Milton Roy y evaluada cada 30 minutos en las primeras 12 horas y una medición final a las 26 horas de fermentación, con una curva patrón de peso seco (densidad óptica vs. peso seco) (Figuras 4 y 5).

### **2. Curva patrón de peso seco**

#### **2.1 Obtención de los cultivos.**

Se reactivaron 0.5 mL de los cultivos congelados en viales con 5 mL de caldo MRS-glucosa y se incubaron a 30°C por 24 horas. 4 mL de estos cultivos reactivados se inocularon en 40 mL de medio MRS-almidón y se incubaron a 30°C por 16 horas. Finalmente los 40 mL del precultivo se inocularon en 400 mL de medio MRS-almidón, se incubaron a 30°C por 10 y 11 horas, tiempo en el cual finalizó la fase exponencial de crecimiento para *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201, respectivamente.

#### **2.1.1 Dilución de las muestras.**

Se cosecharon las células centrifugando a 15000 rpm, 15 minutos, a 4°C. El sobrenadante se eliminó y las células se lavaron 2 veces con agua destilada estéril, resuspendiéndolas y centrifugándolas cada vez. Las células limpias se resuspendieron en 40 mL de medio MRS sin almidón, se realizaron las diluciones correspondientes (con medio MRS sin almidón) y se les determinó la  $DO_{600nm}$ .

### 2.1.1.1 Separación y secado de células

Utilizando membranas HVLP 04700 Millipore de  $0.45\mu\text{m}$  de tamaño de poro y 45 mm de diámetro ligeramente humedecidas con agua destilada estéril (se secaron anticipadamente en una estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante) y un equipo de filtración (Millipore) se filtraron las células diluidas a las cuales se les había determinado previamente la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$ . A continuación, las células retenidas en las membranas se lavaron 2 veces con 20 mL de agua destilada estéril.

Las membranas se secaron hasta peso constante y se pesaron, con la diferencia de peso inicial y final se calculó el peso seco. Con los valores de DO y de peso seco de los cultivos se construyeron las curvas de peso seco (Figuras 4 y 5).

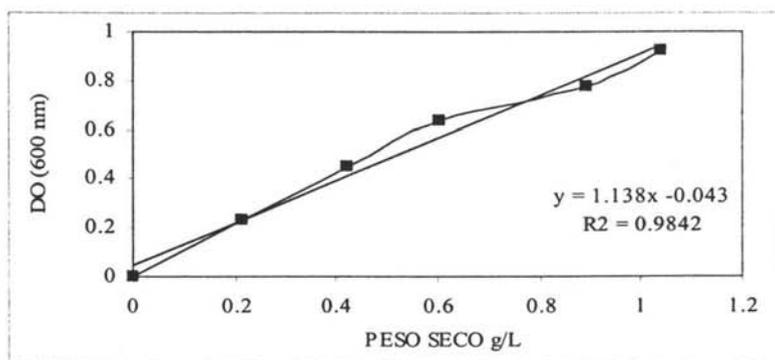


Figura 4. Curva de biomasa vs DO de *S. bovis* A12203.

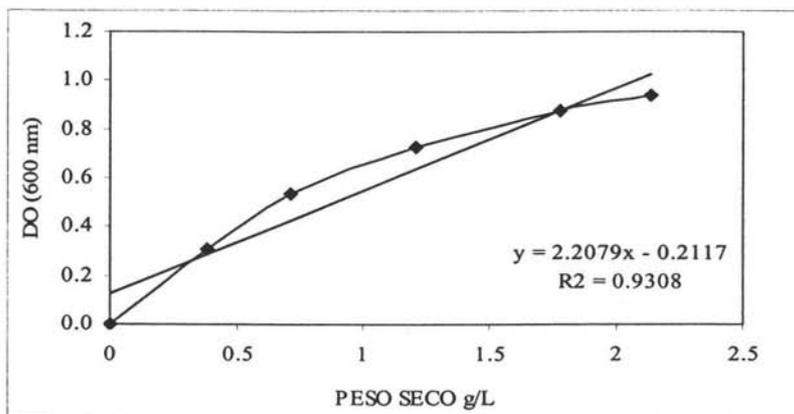


Figura 5. Curva de biomasa vs DO de *S. macedonicus* A12203

### 5.3 Estimación de Parámetros Cinéticos

Los parámetros cinéticos estimados en este estudio fueron calculados a partir de datos obtenidos del seguimiento de las fermentaciones.

Se calculó velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ ) y el rendimiento de amilasa con respecto a la biomasa ( $Y_{amy/x}$ ) durante la fase exponencial de crecimiento como la pendiente de la recta obtenida de la regresión lineal del ln de la biomasa vs. el tiempo y la actividad amilolítica vs. la biomasa, respectivamente.

La velocidad específica de producción de amilasa se calculó de acuerdo con Pirt (1985) como:

$$q_{amy} = \mu \cdot Y_{amy/x}$$

## CAPITULO VI. RESULTADOS

### 6.1 Confirmación de pureza de las cepas

Se confirmó la pureza de las cepas cuando se observó la homogeneidad en la morfología de las colonias y de las células cuando se observaron al microscopio (cocos agrupados en cadenas y pares, Gram positivos). La prueba de la catalasa resultó negativa.

### 6.2 Determinación de la actividad amilolítica asociada a las células y extracelular.

Tanto en el sobrenadante como en las células de ambas cepas se encontró actividad amilolítica, sin embargo, esta fue notablemente más alta en estas últimas (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad amilolítica de las cepas de *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201

ACTIVIDAD AMIOLÍTICA (U/L)		
MEDICIÓN EN	CEPA	
	<i>S. macedonicus</i> A 45201	<i>S. bovis</i> A 12203
SOBRENADANTE	6	37
CÉLULAS	62	102

Debido a este resultado, las mediciones posteriores de la actividad amilolítica solo se realizaron en las células.

### 6.3 FERMENTACIÓN DEL ALMIDÓN POR *S. bovis* A12203 EFECTO DEL pH Y DE LA TEMPERATURA

#### a) Fermentación a pH 4.5 y 30°C

Bajo estas condiciones de fermentación no se observó un incremento en la producción de biomasa ni cambio en el pH inicial del medio de cultivo, por lo que no se consideró necesario medir la actividad amilolítica ni hacer la cuantificación de carbohidratos.

#### b) Fermentación a pH 6.5 y 30°

Al cabo de tres horas de fermentación, *S. bovis* A12203 alcanzó la fase exponencial (que finalizó alrededor de las 7.5 horas) y creció a una velocidad específica de  $0.53 \text{ hr}^{-1}$  (Figura 6A).

La actividad amilolítica aumentó desde la tercera hora de fermentación y de forma más acelerada a partir de la quinta hora, a pesar de esto fue entre las 8 y las 12 horas cuando se observaron los valores máximos (808 y 853 U/L respectivamente). Después de este periodo de tiempo y hasta las 26 horas la actividad se mantuvo prácticamente constante (738 U/L) (Figura 6A). La velocidad de producción de amilasa fue de  $174 \text{ U (g células)}^{-1}\text{hr}^{-1}$  y se determinó un rendimiento de amilasa relativo a biomasa de  $328 \text{ (U g}^{-1}\text{)}$ .

Después de las seis horas el pH disminuyó hasta 5.3 y se mantuvo casi constante hasta las 26 horas cuando se alcanzó un valor de 4.7 (Figura 6B).

Respecto a los carbohidratos totales se observó que no hay una diferencia importante en la concentración de carbohidratos presentes en el medio de cultivo al inicio y al final de la fermentación. Solo un 11% de ellos fue aprovechado por el microorganismo (Figura 6C).

Durante las primeras seis horas de fermentación ocurrió la hidrólisis de la mayor parte del sustrato, después de 26 horas un 37% del almidón permaneció integró (Figura 6C).

El incremento en la concentración de azúcares reductores fue mínimo, ya que al inicio de la fermentación se determinaron 0.24 g/L y 0.38 g/L a las 26 horas, durante este periodo de tiempo no se observó acumulación de estos azúcares (Figura 6D).

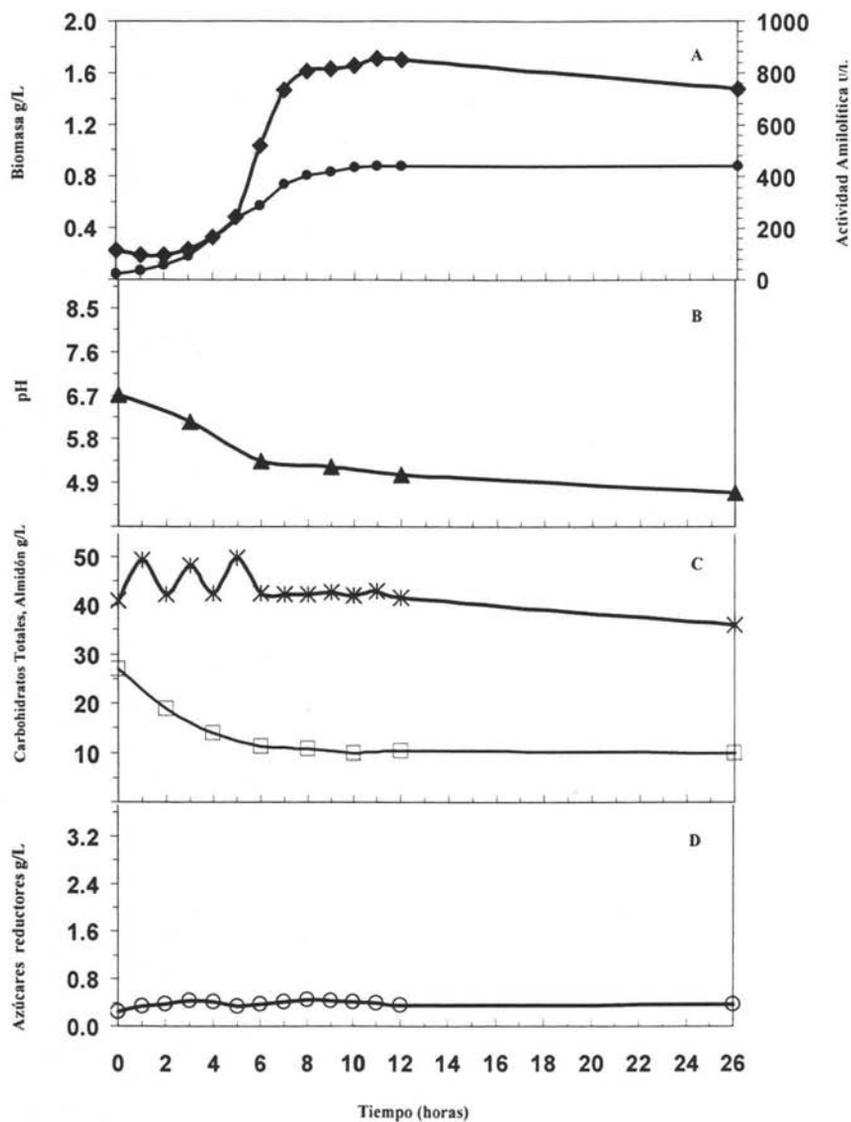


Figura 6. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. bovis* A12203 a pH 6.5 y 30°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

### c) Fermentación a pH 8.5 y 30°C

Después de la fase lag de dos horas (Figura 7A), el microorganismo se desarrolló a una velocidad específica de crecimiento de  $0.57 \text{ hr}^{-1}$ . Durante la fase estacionaria, que inició a las 7.5 horas y a un pH alrededor de 4.8 (Figura 7B) se apreciaron dos puntos máximos de actividad amilolítica: a las 8 (904 U/L) y a las 12 horas (947 U/L) (Figura 7A), a partir de esta hora se mantuvo la actividad de la enzima casi constante hasta las 26 horas (824 U/L) (Figura 7A).

El rendimiento de amilasa relativo a la biomasa fue de  $393 \text{ U g}^{-1}$  y se determinó que la velocidad específica de producción de amilasa fue de  $224 \text{ U (g células)}^{-1}\text{hr}^{-1}$ .

Apenas en la quinta hora de fermentación, el 72% del almidón presente en el medio de cultivo ya había sido hidrolizado y un 24% del sustrato permaneció intacto hasta las 26 horas. Se determinó que un 36% de los carbohidratos totales fueron consumidos a lo largo de 26 horas de fermentación (Figura 7C).

Se observó una acumulación importante de azúcares reductores a las cinco horas de fermentación (2.4 g/L), pero después de este tiempo y hasta las 8 horas se presentó un decremento drástico en la concentración de estos azúcares (1.3 g/L), en las horas siguientes el aprovechamiento de éstos se volvió paulatino, hasta llegar a una concentración de 0.7 g/L a las 26 horas (Figura 7D).

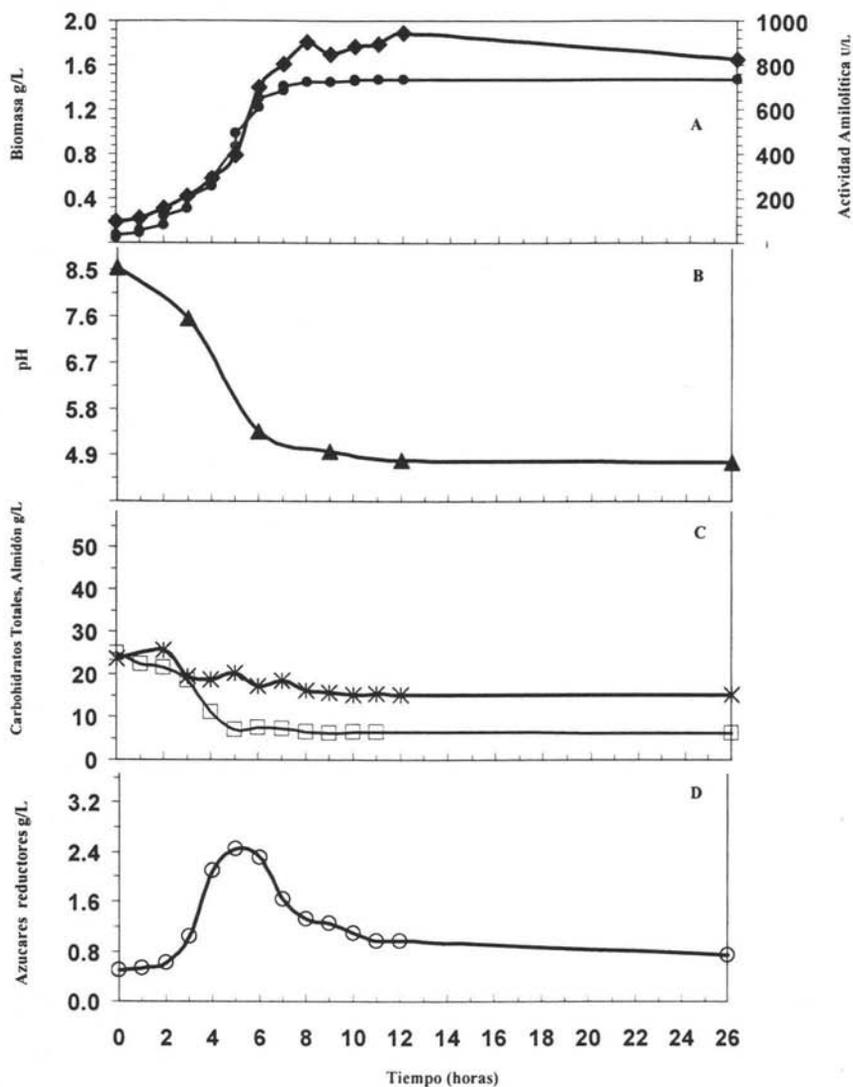


Figura 7. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. bovis* A12203 a pH 8.5 y 30°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

#### **d) Fermentación a pH 6.5 y 37°C**

La quinta hora de fermentación marcó el final de la fase exponencial (Figura 8A) durante la que se presentó una velocidad específica de crecimiento de  $0.75 \text{ hr}^{-1}$ . La actividad amilolítica a las 3 horas de fermentación era de 145 U/L y a partir de este tiempo se incrementó dramáticamente hasta las 7 y 8 horas, cuando se presentaron los valores más altos (971 y 967 U/L respectivamente), a las 9 horas disminuyó ligeramente y se mantuvo casi constante por 2 horas más. La actividad se redujo hasta 354 U/L a las 26 horas (Figura 8A).

La velocidad específica de producción de amilasa fue de  $759 \text{ U (g células)}^{-1}\text{hr}^{-1}$ , mientras que el rendimiento de amilasa relativo a la biomasa presentó un valor de  $1012 \text{ U g}^{-1}$ .

El decremento del pH hasta un valor de 5.0 ocurrió después de seis horas de fermentación, sin embargo el pH del medio a las 26 descendió hasta un valor de 4.8 (Figura 8B).

A las 26 horas, el 65% de los carbohidratos totales permanecieron en el medio de cultivo sin ser aprovechados (Figura 8C). El 57% del almidón fue hidrolizado al final de la fermentación, la mayor parte durante las primeras cuatro horas (Figura 8C).

Desde el inicio de la fermentación y hasta las 5 horas se acumularon los azúcares reductores (de 1.1 a 3 g/L), después de este tiempo la mayoría fueron consumidos, aunque más específicamente entre las 6 y 7 horas (Figura 8D).

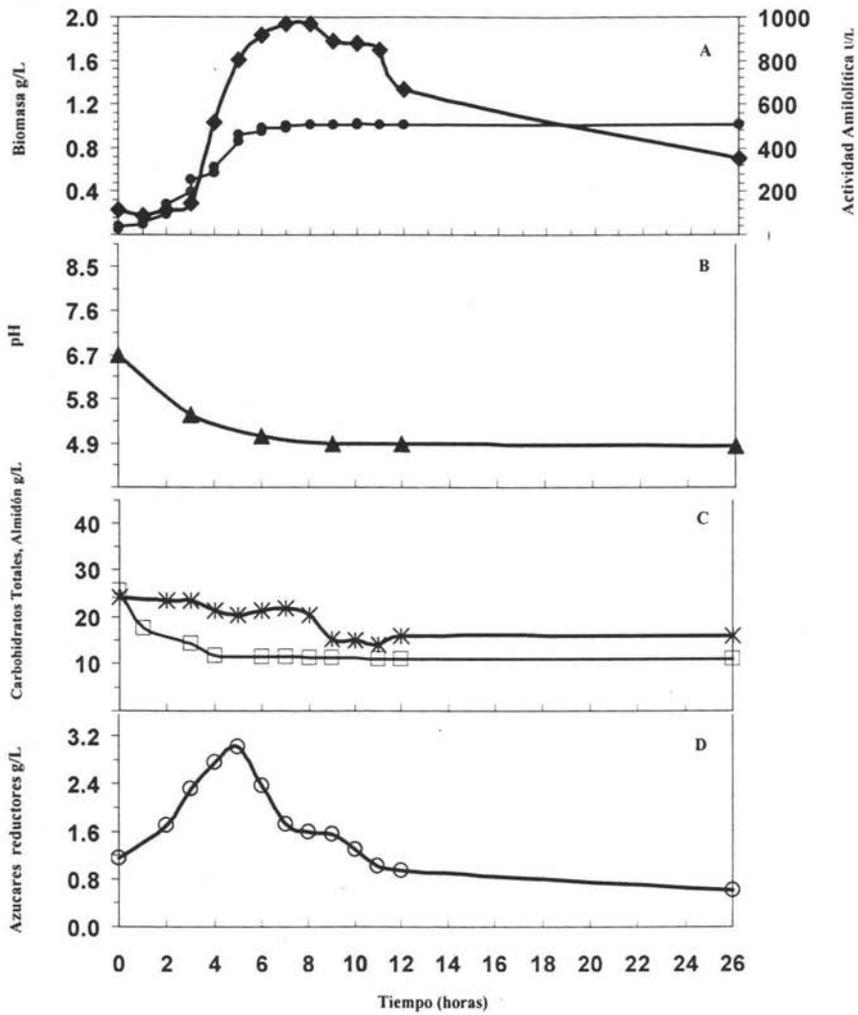


Figura 8. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. bovis* A12203 a pH 6.5 y 37°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

#### e) Fermentación a pH 6.5 y 40°C

A partir de la segunda y hasta las 4.5 horas de fermentación se presentó la fase exponencial (Figura 9A), lográndose determinar una velocidad específica de crecimiento de  $1.08 \text{ hr}^{-1}$ .

En la segunda hora de fermentación, la actividad que presentaba la enzima era mínima (de 129 U/L), pero en las siguientes horas ésta empezó a aumentar considerablemente y entre la quinta y la sexta hora de fermentación se alcanzaron los valores mas altos de actividad amilolítica bajo estas condiciones (915 y 902 U/L respectivamente). A partir de la séptima hora la actividad empezó a disminuir gradualmente hasta llegar a un valor de 116 U/L al finalizar la fermentación (Figura 9A). El rendimiento de amilasa relativo a biomasa fue de  $1566 \text{ U g}^{-1}$ , mientras que la velocidad específica de producción de la enzima fue de  $1692 \text{ U (g células)}^{-1}\text{hr}^{-1}$ . Al cabo de 26 horas de fermentación el pH del medio descendió hasta 4.7, sin embargo la reducción fue visiblemente mas rápida en las primeras 6 horas pues se registró un valor de 4.9 (Figura 9B).

La diferencia de concentración entre carbohidratos totales iniciales y finales fue pequeña ya que solamente el 27% de estos se utilizaron a lo largo de la fermentación (Figura 9C).

Después de 26 horas, el 40% de almidón permaneció íntegro (Figura 9C).

La concentración inicial de azúcares reductores era de  $0.17 \text{ g/L}$ , a medida que transcurrió el tiempo se observó un ligero incremento de éstos, presentándose la concentración más alta a las 6 horas ( $1.0 \text{ g/L}$ ) y enseguida un rápido decremento hasta un valor de  $0.45 \text{ g/L}$  a las 8 horas. Al finalizar la fermentación,  $0.31 \text{ g/L}$  permanecieron en el medio de cultivo (Figura 9D).

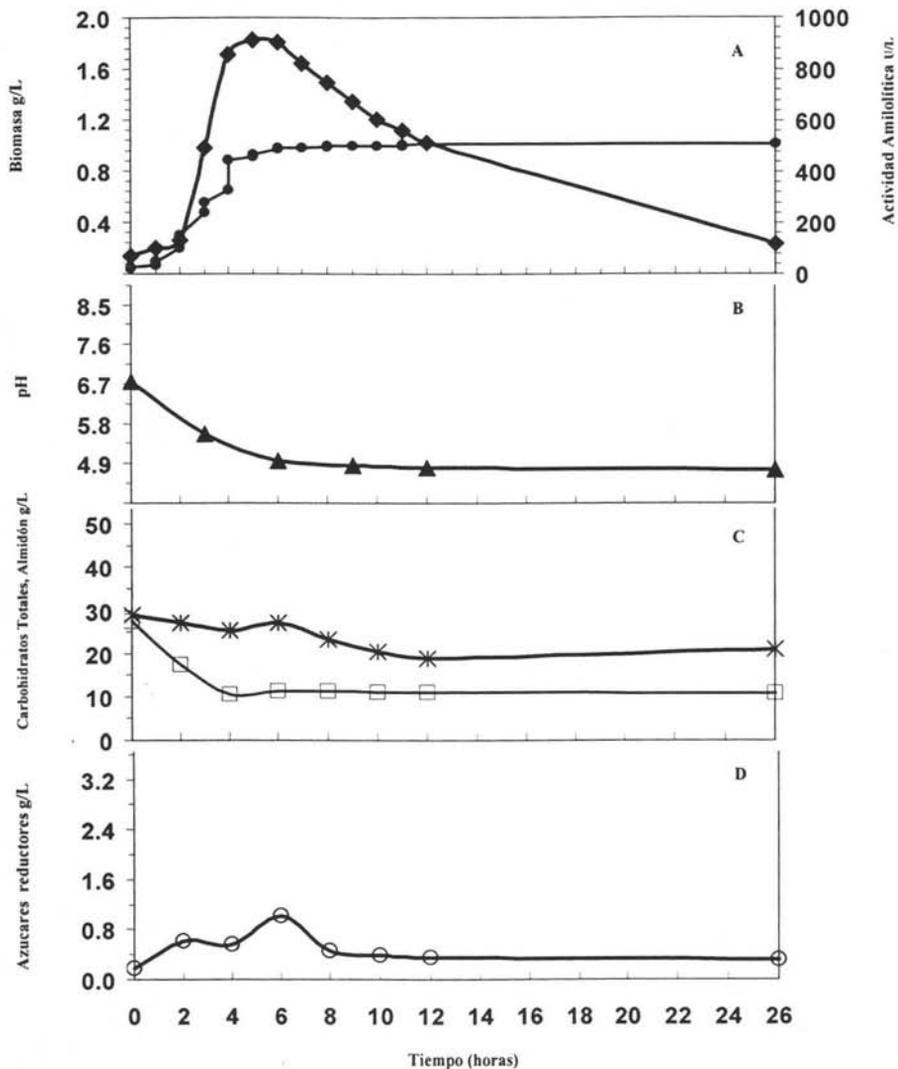


Figura 9. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. bovis* A12203 a pH 6.5 y 40°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

#### f) Fermentación a pH 8.5 y 40°C

Bajo estas condiciones *S. bovis* A12203 presentó un patrón bifásico de crecimiento, es decir: una primera fase exponencial de las 0.5 a las 2 horas y una segunda fase exponencial de las 3.5 horas a las 10.5 horas, la velocidad específica de crecimiento fue de 0.83 y 0.23  $\text{hr}^{-1}$  respectivamente (Figura 10A). De igual forma se observaron dos puntos máximos de actividad amilolítica (Figura 10A), el primero a las 6 horas (193 U/L) y el segundo a las 10 horas (451 U/L), mientras que la velocidad específica de producción de amilasa fue de 165 ( $\text{U g}^{-1}$ ) y el rendimiento de amilasa relativo a biomasa fue de 589  $\text{U g}^{-1}$ .

La disminución del pH presentó dos puntos importantes: un descenso lento durante las primeras 6 horas hasta un pH de 7.7 y un decremento más visible en las horas posteriores. A las 12 horas se alcanzó un pH de 5.1 que se mantuvo constante hasta las 26 horas (Figura 10B). La fermentación de carbohidratos fue incompleta, pues solo el 31% de éstos fueron consumidos después de 26 horas de fermentación (Figura 10C). El 93% del almidón fue hidrolizado de manera más importante en las primeras 10 horas (Figura 10C). A las 26 horas solo el 7% permanecía íntegro.

Desde el inicio de la fermentación y hasta las 9 horas la concentración de azúcares reductores se incrementó gradualmente (de 0.16 a 1.05 g/L de glucosa). En esta hora se presentó la concentración máxima de estos azúcares. Durante las siguientes 2 horas el 74% de ellos fueron consumidos rápidamente (Figura 10D).

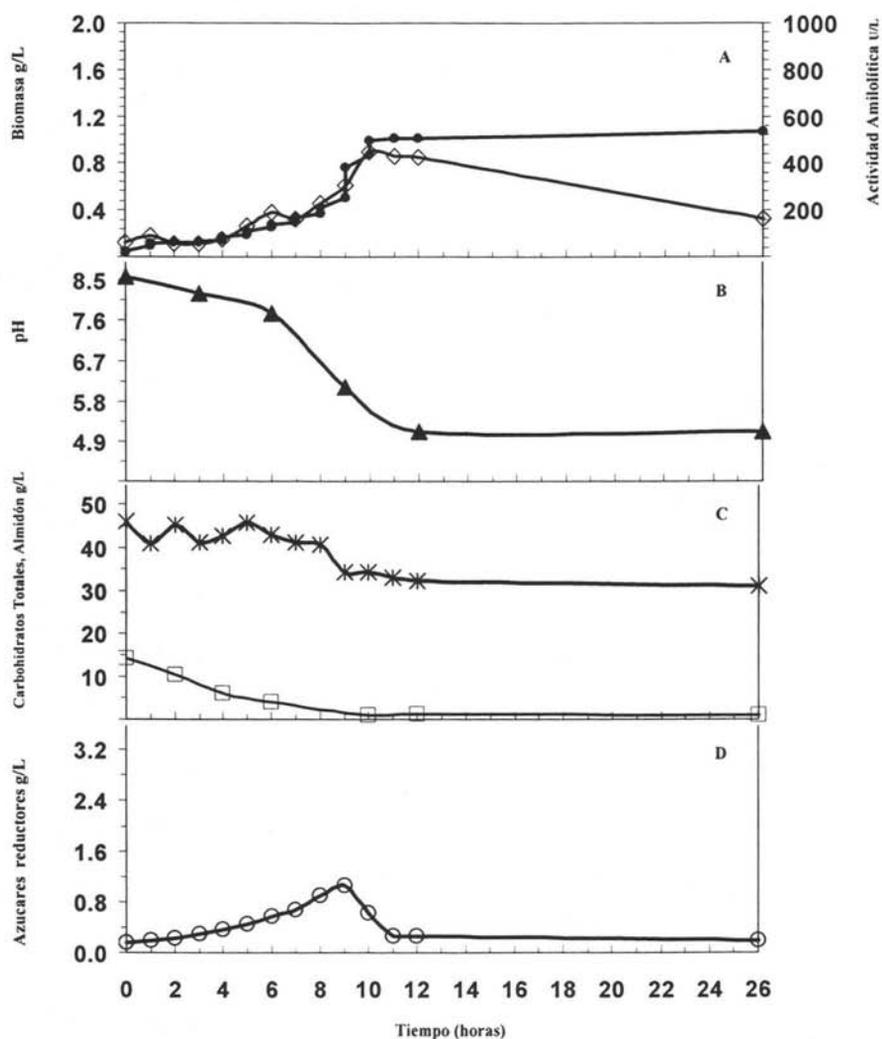


Figura 10. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. bovis* A12203 a pH 8.5 y 40°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◇)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

Tabla 6. Parámetros cinéticos de *S. bovis* A12203 obtenidos de la fermentación de almidón bajo diferentes condiciones de temperatura y de pH

CEPA	<i>S. bovis</i> A12203				
	pH 6.5, 30°C	pH 8.5, 30°C	pH 6.5, 37°C	pH 6.5, 40°C	pH 8.5, 40°C
pH y T					
$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	0.53	0.55	0.75	1.08	0.83 *
					0.23 **
Y amy (u g <sup>-1</sup> )	328	393	1012	1566	589
q amy [U(g células peso seco) <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> ]	174	216	759	1692	165

$\mu_{\max}$  (velocidad específica de crecimiento),  $Y_{\text{amy}/x}$  (rendimiento de amilasa con respecto a biomasa),  $q_{\text{amy}}$  (Velocidad específica de producción de amilasa)\* 1ª Fase exponencial, \*\* 2ª Fase exponencial

## 6.4 Fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201

### Efecto del pH y de la temperatura

#### a) Fermentación a pH 4.5 y 40°C

Durante 12 horas de fermentación en las condiciones descritas no se observó crecimiento en el medio de cultivo, ni cambio en el pH inicial del medio. Más tarde, a las 26 horas, se observó una mayor turbidez con respecto a la que se apreció al inicio de la fermentación

#### b) Fermentación a pH 6.5 y 30°C

Una hora después de haberse iniciado la fermentación se presentó la fase exponencial de crecimiento, que se prolongó hasta las 12 horas (Figura 11A). En esta etapa se determinó una velocidad específica de crecimiento de  $1.52 \text{ hr}^{-1}$ .

Se presentaron dos puntos máximos de actividad amilolítica, el primero a las 7 (419 U/L) y el segundo a las 11 horas (355 U/L). A las 12 horas el decremento de la actividad fue evidente, pues en esta hora se determinó un valor de 197 U/L, que se mantuvo constante hasta las 26 horas (Figura 8A). La velocidad específica de producción de amilasa así como el rendimiento de ésta relativo a la biomasa fue de  $198 \text{ U (g células)}^{-1}\text{hr}^{-1}$  y  $130 \text{ U g}^{-1}$  respectivamente.

Durante las primeras nueve horas el pH disminuyó de manera constante hasta llegar a un valor de 4.9. A las 26 horas el pH era de 4.72 (Figura 11B).

El análisis de carbohidratos totales reveló que el 68% de estos no fueron consumidos al término de la fermentación (Figura 11C).

Después de 26 horas de fermentación, el 62% del almidón presente en el medio de cultivo fue hidrolizado, la mayor parte de este en las primeras cuatro horas (Figura 11C).

Se produjo una pequeña acumulación de azúcares reductores a las 4 horas ( $0.7 \text{ g/L}$ ) y una mayor a las 8 horas, en la que se originaron  $1.1 \text{ g/L}$  (Figura 11D).

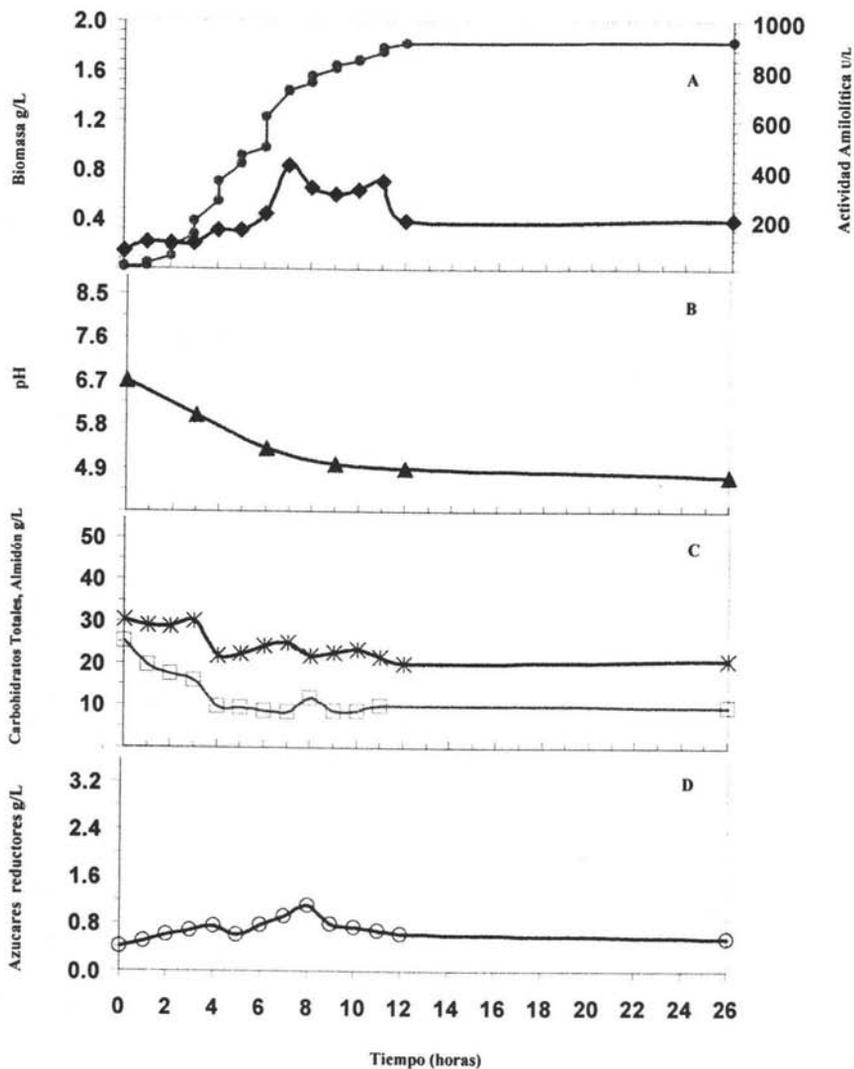


Figura 11. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201 a pH 6.5 y 30°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

### c) Fermentación a pH 8.5 y 30°C

Estas condiciones de crecimiento propiciaron que la fase exponencial de crecimiento se presentara alrededor de las cinco horas y se extendiera hasta las 11 horas (Figura 12A), *S. macedonicus* A45201 creció a una velocidad específica de  $0.9 \text{ hr}^{-1}$ . A partir de las 3 horas de fermentación el incremento de la actividad amilolítica fue evidente, a las 12 horas se presentó el valor mas alto de actividad (594 U/L) y permaneció casi constante hasta las 26 horas de fermentación (549 U/L) (Figura 12A). La amilasa se produjo a un velocidad específica de  $497 \text{ U (g células)}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ , el rendimiento de ésta relativo a la biomasa fue de  $552 \text{ U g}^{-1}$ .

Desde el inicio de la fermentación se observó una disminución constante del pH hasta un valor de 5.3 a las 9 horas y un valor final de 4.8 a las 26 horas (Figura 12B).

De los carbohidratos totales presentes en el medio de fermentación solo el 39% fueron utilizados después de 26 horas de crecimiento del microorganismo (Figura 12C).

El almidón no fue hidrolizado en su totalidad ya que 28 % de este se encontraba integro a las 26 horas (Figura 12C). La concentración inicial de azúcares reductores en el medio de cultivo era de  $0.2 \text{ g/L}$ , ésta fue incrementándose hasta alcanzar una concentración máxima que se presento en la octava hora de fermentación ( $1.0 \text{ g/L}$ ). En las siguientes horas la concentración de estos azúcares disminuyó gradualmente, aunque sin desaparecer totalmente del medio pues se detectó una concentración de  $0.41 \text{ g/L}$  a las 26 horas (Figura 12D).

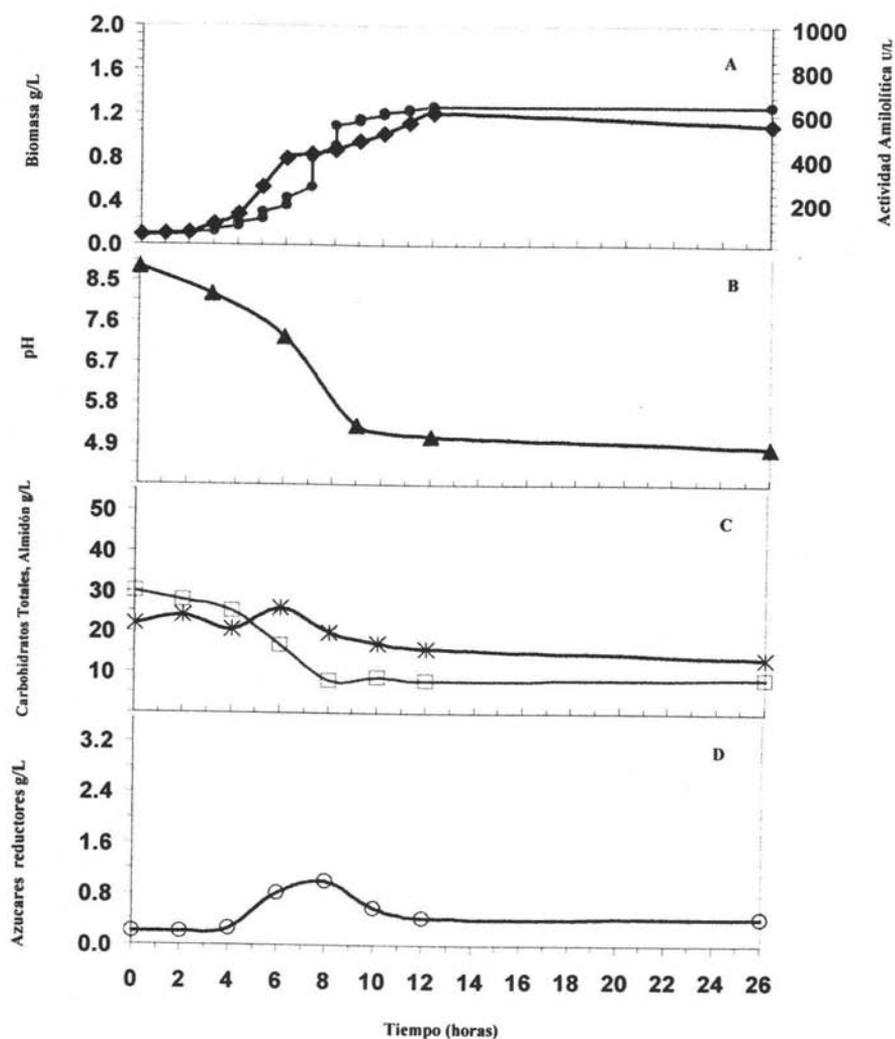


Figura 12. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201 a pH 8.5 y 30°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

#### d) Fermentación a pH 6.5 y 37°C

El microorganismo creció a una velocidad específica de  $1.56 \text{ hr}^{-1}$ , durante la fase exponencial de crecimiento que se presentó entre la primera y la sexta hora de fermentación (Figura 13A). La actividad amilolítica se incrementó rápidamente desde las 2 horas y fue a las 6 horas cuando se presentó la máxima actividad ( $697 \text{ U/L}$ ), en las siguientes dos horas se apreció un ligero decremento y nuevamente un pequeño aumento a las 10 horas de fermentación hasta un valor de  $646 \text{ U/L}$ . A las 26 horas la actividad amilolítica era de  $262 \text{ U/L}$  (Figura 13A). El rendimiento de amilasa relativo al sustrato y la velocidad específica de producción de esta fue de  $382 \text{ U g}^{-1}$  y de  $597 \text{ U (g células)}^{-1}\text{hr}^{-1}$  respectivamente.

Fueron necesarias 9 horas para que el pH llegara a un valor de 4.8 y se mantuviera así hasta que finalizó la fermentación a las 26 horas (Figura 13B).

El 62% del almidón presente en el medio de cultivo fue hidrolizado rápidamente en las primeras seis horas (Figura 13C), por otro lado, el 79% de los carbohidratos totales permanecieron en el medio al final de la fermentación (Figura 13C).

Al inicio de la fermentación la concentración de azúcares reductores era de  $0.18 \text{ g/L}$ , en la sexta hora se observó una ligera acumulación, pues se produjeron  $0.47 \text{ g/L}$ , de los cuales solo un 29% fueron utilizados en las horas posteriores. La concentración de estos azúcares a las 26 horas era de  $0.33 \text{ g/L}$  (Figura 13D).

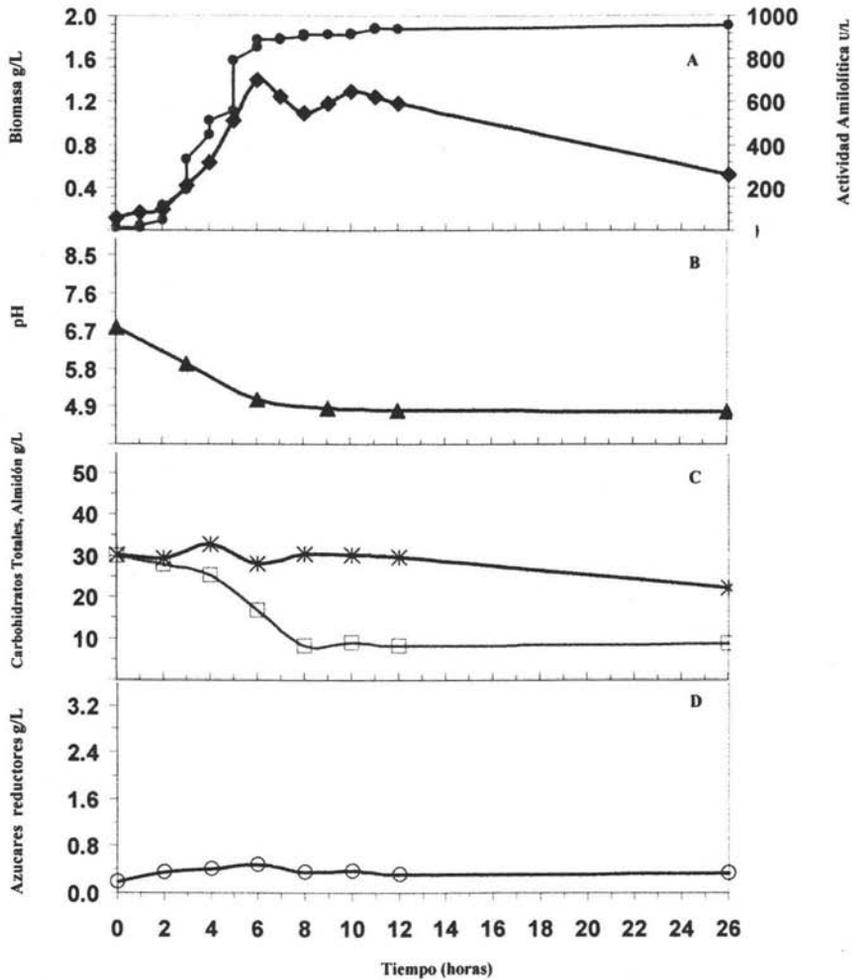


Figura 13. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201 a pH 6.5 y 37°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (\*)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

#### e) Fermentación a pH 6.5 y 40°C

A partir de la primera hora de fermentación *S. macedonicus* A45201 creció exponencialmente a una velocidad de  $2.19 \text{ hr}^{-1}$ . Después de 5 horas de fermentación se presentó la fase estacionaria (Figura 14A) y fue al inicio de esta, cuando se alcanzó la mayor actividad amilolítica ( $695 \text{ U/L}$ ). En las siguientes horas se redujo la actividad amilolítica ya que en la décima hora la actividad era de  $357 \text{ U/L}$  y de  $115 \text{ U/L}$  a las 26 horas de fermentación (Figura 14A).

El rendimiento de amilasa relativo a la biomasa y la velocidad específica de producción de la enzima fue de  $449 \text{ U g}^{-1}$  y  $983 \text{ U (g células)}^{-1} \text{ hr}^{-1}$  respectivamente.

El pH disminuyó sobre todo en las primeras 6 horas hasta un valor de 5.2 y se mantuvo casi constante después de esta hora ya que el pH al final de la fermentación, es decir a las 26 horas, era de 5 (Figura 14B).

Después de 4 horas de fermentación el 62% del almidón presente en el medio de cultivo ya había sido hidrolizado (Figura 14C). El 79% de los carbohidratos totales permanecieron en el medio cuando la fermentación había concluido (Figura 14C). En la cuarta hora de fermentación la concentración de azúcares reductores aumentó de  $0.17 \text{ g/L}$  a  $0.9 \text{ g/L}$  y de estos, más del 50% fueron consumidos rápidamente después de este tiempo y hasta la sexta hora. A las 26 horas la concentración era de  $0.32 \text{ g/L}$  (Figura 14D).

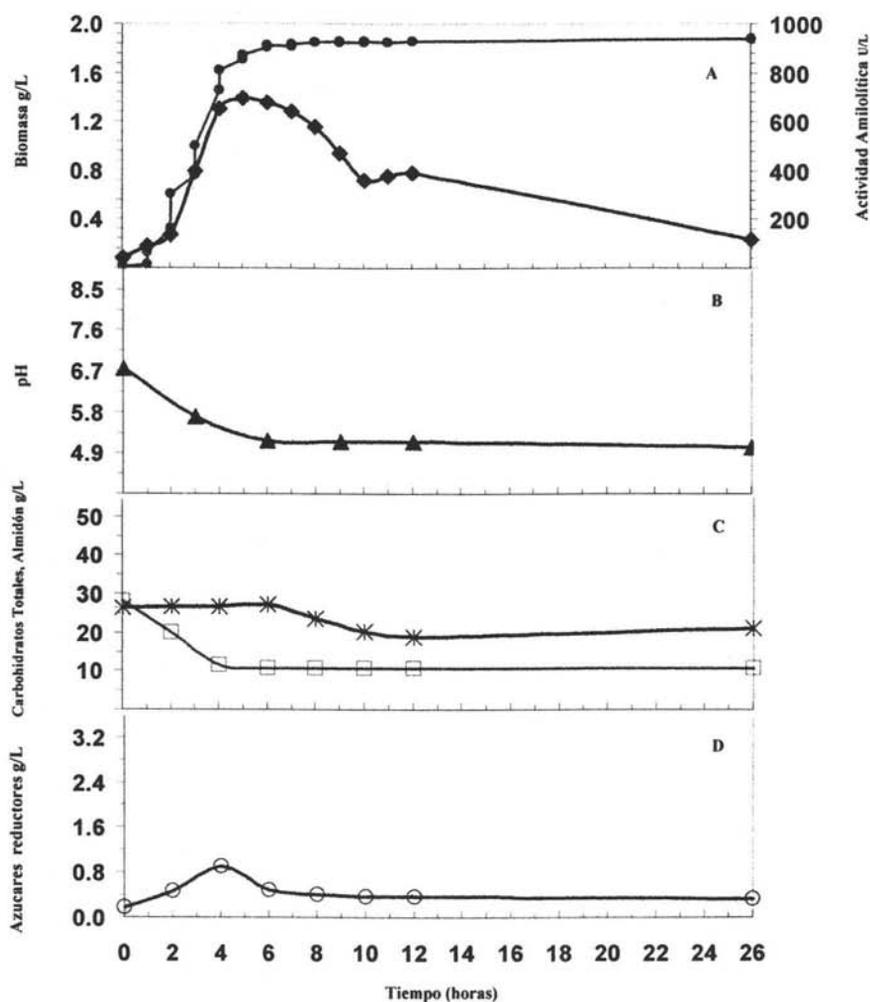


Figura 14. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201 a pH 6.5 y 40°C.

- A) Concentración de biomasa (●) y actividad amilolítica (◆)
- B) pH del medio de cultivo (▲)
- C) Concentración del almidón (□) y carbohidratos totales (✱)
- D) Concentración de azúcares reductores (○).

#### f) Fermentación a pH 8.5 y 40°C

Se determinó una DO inicial de 0.09 en el medio de cultivo, que se mantuvo constante hasta las 6 horas, a partir de este tiempo los valores de DO disminuyeron gradualmente hasta llegar a un valor de 0.04 a las 26 horas (Figura 15A). La disminución del pH fue mínimo, pues sólo se llegó a un valor de 8.3 a las 26 horas de fermentación (Figura 15B).

A las 26 horas se observó una especie de polímero de aspecto viscoso y blanco inmerso en el medio de cultivo, en el que también estaban presentes algunos hilillos que le daban cierta turbidez al medio.

El almidón del medio fue hidrolizado desde el inicio de la fermentación, después de 26 horas de fermentación el 43% permanecía intacto en el medio de cultivo (Figura 15C).

Para descartar una posible contaminación del medio de cultivo se tomaron dos muestras del polímero, la primera se sembró en cajas Petri con medio MRS-almidón, en las que se observó el crecimiento de colonias pequeñas que presentaban halos de hidrólisis del almidón alrededor de ellas. De la segunda muestra se hizo un frotis que se observó al microscopio después de una tinción de Gram, la cual reveló que se trataba de cocos Gram positivos agrupados en cadenas.

Posteriormente se realizó la prueba de la catalasa tanto en las colonias que crecieron en las cajas como en los microorganismos provenientes del polímero y esta prueba resultó negativa.

Para determinar si el microorganismo se comportaba de la misma manera bajo estas condiciones (pH 8.5 y 37°C) se repitió la fermentación y se observaron los resultados anteriormente descritos.

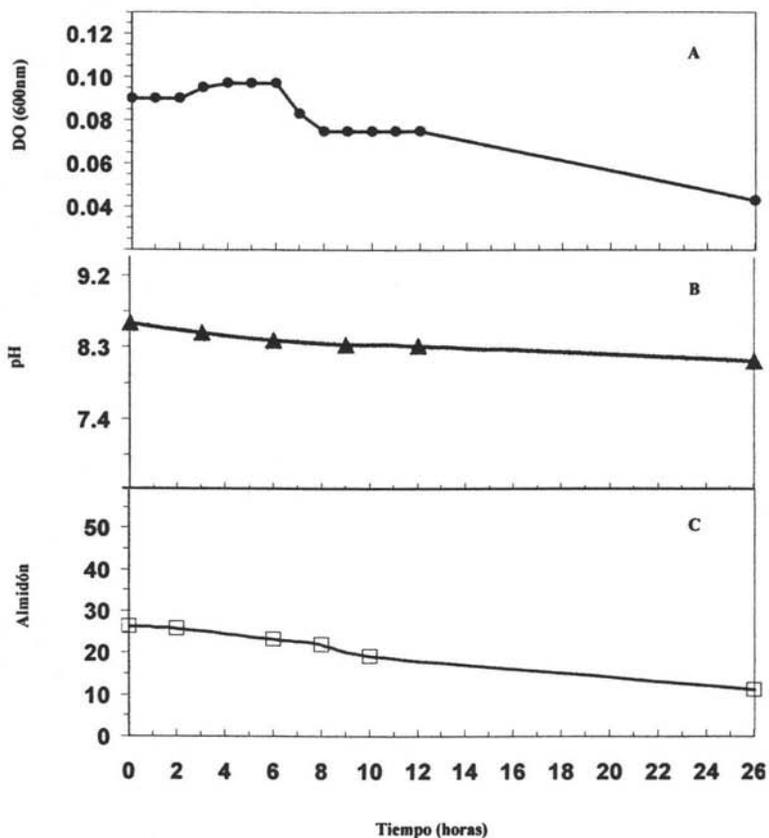


Figura 15. Resultados de los parámetros evaluados a lo largo de la fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201 a pH 8.5 y 40°C.

- E) Densidad óptica (●)
- F) pH del medio de cultivo (▲)
- G) Concentración del almidón (□)

Tabla 7. Parámetros cinéticos de *S. macedonicus* A45201 obtenidos de la fermentación de almidón bajo diferentes condiciones de temperatura y de pH

CEPA	<i>S. macedonicus</i> A45201			
	pH 6.5, 30°C	pH 8.5, 30°C	pH 6.5, 37°C	pH 6.5, 40°C
pH y T				
$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	1.52	0.90	1.56	2.19
Y amy (U g <sup>-1</sup> )	130	552	382	449
q amy [U(g células peso seco) <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> ]	198	497	597	983

$\mu_{max}$  (velocidad específica de crecimiento),  $Y_{amy/x}$  (rendimiento de amilasa con respecto a biomasa),  $q_{amy}$  (Velocidad específica de producción de amilasa)

## CAPITULO VII. DISCUSIÓN

### 7.1 Determinación de la actividad amilolítica asociada a las células y extracelular

*S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201 pertenecen a una colección de 40 cepas aisladas del pozol, que se identificaron como las de mayor actividad amilolítica.

En este estudio se determinó que las amilasas producidas por ambas se encuentran asociadas a la célula (Tabla 5) tal es el caso de *S. bovis* 25124, *Lactococcus lactis* A45212 y *Enterococcus sulfureus* A36202 (Díaz y col. 2003).

La mayoría de las bacterias lácticas aisladas de otros alimentos, que se han estudiado de manera más profunda, producen amilasas extracelulares, tal es el caso de *Lactobacillus amylovorus* (Rodríguez-Sanoja y col. 2000), *Lactobacillus plantarum* A6 (Giraud y col. 1997) y *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyot y col. 1998). Sin embargo, existen reportes de cepas como *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 (Agati y col. 1998) y *Streptococcus mutans*, principal agente responsable de la caries dental (Simpson y col. 1998) que producen amilasas extracelulares y asociadas a la célula.

Es común encontrar a *S. bovis* en el tracto digestivo de rumiantes (Hardie y col.1986) y a diferencia de las cepas que se aislaron del pozol (*S. bovis* A12203 y 25124), las del rumen (JB1 y 148) poseen actividad amilolítica intracelular y extracelular (Satoh y col. 1993; 1997).

## 7.2 Fermentación del almidón por *S. bovis* A12203

### Influencia del pH sobre el crecimiento y la actividad amilolítica

#### ▲ Influencia del pH

Los resultados obtenidos indican que la influencia del pH es importante en el crecimiento de esta cepa, ya que al evaluarlo durante las fermentaciones realizadas a pH inicial de 4.5, 6.5 y 8.5 (todas incubadas a 30°C) se encontraron claras diferencias en el comportamiento del microorganismo.

Se ha reportado a *S. bovis* como un habitante común del rumen. Hungate y col. (1997) notaron un descenso en las cuentas de este microorganismo cuando fue expuesto a un ambiente ácido (pH 5.6).

Lo anterior coincide con los resultados de este trabajo, ya que la cepa A12203, aislada del pozol, no creció en el medio de cultivo ajustado a un pH de 4.5 y cabe resaltar que en los ensayos a pH 8.5 y 6.5 (figuras 7 y 8) el inicio de la fase estacionaria se presentó cuando el pH de los medios había descendido aproximadamente hasta 5 (alrededor de las 8 horas).

El crecimiento de *S. bovis* A12203 a pH 6.5 y 8.5 fue muy similar, ya que la velocidad específica de crecimiento resultó ser muy parecida (Tabla 6) y la fase exponencial de crecimiento finalizó a las 7.5 horas cuando el pH de los medios era cercano a 5. A pesar de esto, la concentración de biomasa obtenida de la fermentación a pH 8.5 fue mucho mayor que la que se obtuvo a pH 6.5 (figuras 6 y 7).

La actividad amilolítica bajo ambas condiciones de pH fue elevada, los valores máximos se presentaron en el mismo intervalo de tiempo (de las 8 a las 12 horas) y se mantuvieron casi constantes hasta las 24 horas (figuras 6 y 7).

Sin embargo, es claro que la actividad de la enzima mejoró al encontrarse a pH básico (8), pues se obtuvieron valores más altos, un mejor rendimiento de amilasa relativo a la biomasa y un incremento en la velocidad específica de producción de amilasa (Tabla 6).

El pH inicial del pozol se encuentra en un rango de 6.5 a 7.5 (Wacher y col. 1993). Si consideramos que *S. bovis* es un microorganismo que se encuentra desde el inicio en este alimento (Díaz y col. 2003) y además es capaz de crecer a valores de pH de 9.6 (Hardie y col. 1986) entonces es común que esta cepa se haya desarrollado de manera favorable cuando fue expuesta a valores de pH de 8.5. y 6.5.

A diferencia de las especies del género *Lactobacillus* que son acidófilicos o acidúricos (Hammes y Vogel, 1995), el crecimiento de bacterias del género *Streptococcus* es inhibido cuando se encuentra en ambientes ácidos (Hardie y col. 1986). Esto concuerda con el hecho de que la proporción de bacterias lácticas amilolíticas se reduce a medida que la masa con la que se elabora el pozol se va acidificando (Díaz y col. 2003).

El pH final de los medios después de 24 horas fue de 4.7 en las fermentaciones realizadas a pH 6.5 y 8.5, aunque en esta última el descenso ocurrió en menor tiempo (figuras 6 y 7). Cuando *S. bovis* A12203 creció a pH 6.5 no se observó una acumulación de azúcares reductores, lo mismo se observó durante el crecimiento de *S. bovis* 25124 bajo estas mismas condiciones (Díaz y col. 2003), sin embargo a pH 8.5 *S. bovis* A12203 registró una importante acumulación de estos azúcares alrededor de la octava hora. Esta utilización o disminución de azúcares ocurrió durante la fase exponencial de crecimiento y coincidió con el incremento en la actividad amilolítica. En la fermentación a pH 8.5, el porcentaje de carbohidratos utilizados y de almidón hidrolizado fueron mucho mayores que los observados en la fermentación a pH 6.5.

### ▲ Influencia de la temperatura

Para determinar la influencia de la temperatura sobre el crecimiento y la actividad amilolítica de *S. bovis* A12203, se compararon las fermentaciones realizadas a un pH inicial de 6.5 e incubadas a 30°C, 37°C y 40°C (figuras 6, 8 y 9).

*S. bovis* es un microorganismo que puede crecer en un rango de temperatura de 22 a 45°C (Hardie y col. 1986), pero pequeñas variaciones en la temperatura de incubación pueden evidenciar importantes cambios en su comportamiento, aun más que los que se observaron al evaluar el efecto del pH sobre esta cepa.

En principio, las curvas de crecimiento resultantes de las fermentaciones a 37 y 40°C, son muy semejantes, en ambas la fase exponencial concluyó alrededor de las 5 horas (cuando el pH era aproximadamente de 5), mientras que en la fermentación a 30°C trascurrieron 8 horas para que se presentara la fase estacionaria. Esto puede deberse a que en las primeras, la acidificación de los medios de cultivo fue más rápida, ya que solo habían transcurrido 6 horas y el pH del medio era ya de 4.9, mientras que en la fermentación a 30°C el pH era de 5.3 y seguía disminuyendo (figuras 8 y 9).

El mayor valor de velocidad específica de crecimiento se observó en la fermentación a 40°C ( $1.08 \text{ hr}^{-1}$ ), mientras que la más pequeña en la fermentación a 30°C ( $0.53 \text{ hr}^{-1}$ ). Es decir, a medida que la temperatura de incubación se incrementó, la velocidad específica de crecimiento lo hizo también. Cuando *S. bovis* 25124 fue incubado a 30°C en el mismo medio, se reportó una velocidad específica de crecimiento de  $0.94 \text{ hr}^{-1}$  (Díaz y col. 2003), este es un valor similar al que se observó cuando *S. bovis* A12203 creció a 40°C (tabla 6). Esto refleja el hábitat de la bacteria, ya que es común que la temperatura ambiente en Villahermosa, Tabasco alcance esos valores.

En la fermentación a 37°C se observaron los valores más altos de actividad amilolítica, sin embargo en la fermentación a 40°C el rendimiento de amilasa relativo a biomasa y la velocidad específica de producción de amilasa resultaron ser mayores que los obtenidos de la fermentación a 37°C y aun más que los obtenidos de la fermentación a 30°C.

Estos parámetros (a excepción de la velocidad específica de crecimiento) fueron mayores que los reportados para *S. bovis* 25124, pero definitivamente son menores que los reportados por Guyot y col. (2000) para otras bacterias lácticas como *L. plantarum* y *L. manihotivorans*.

*S. bovis* A12203 mostró la acumulación temporal más alta de azúcares reductores (alrededor de las 5 horas) en la fermentación a 37°C, mientras que a 40°C esta acumulación se presentó a las 9 horas y resultó ser mucho menos visible.

Es claro que se presentaron diferencias en el crecimiento y la actividad amilolítica de esta cepa al ser expuesta a variaciones de pH y de temperatura, sin embargo fue este último factor el que influyó de manera más evidente.

La actividad amilolítica y el crecimiento del microorganismo se incrementaron notablemente cuando la cepa fue incubada a 40°C, lo mismo sucedió cuando se expuso a un pH de 8.5, aunque bajo este último factor el efecto fue menos marcado.

Debido a estos resultados se decidió hacer una fermentación en medio MRS-almidón combinando la temperatura (40°C) y el pH (8.5) en los cuales se obtuvieron los mejores parámetros cinéticos.

### ▲ Fermentación en condiciones óptimas de temperatura y de pH: 40°C y 8.5

La fermentación se realizó bajo las condiciones ya mencionadas en medio MRS-almidón.

La fase exponencial se prolongó hasta las 10.5 horas (figura 10), mientras que bajo las otras condiciones de pH y temperatura esta fue mucho más corta, entre las 4 y 7.30 horas (figuras 6, 7, 8 y 9). Además, se presentó un patrón bifásico de crecimiento (Figura 10), durante el cual se determinaron dos velocidades específicas de crecimiento, la primera de las 0.5 a las 2 horas ( $0.83 \text{ hr}^{-1}$ ) y la segunda de las 3.5 a las 10.5 horas ( $0.23 \text{ hr}^{-1}$ )

La velocidad específica máxima de crecimiento de la primera fase fue similar a la obtenida de la fermentación a 37°C (a pH 6.5), mientras que la segunda resultó ser aun más pequeña que la obtenida de la fermentación a pH 6.5 y 30°C.

En situaciones determinadas, algunos microorganismos pueden presentar este patrón de crecimiento y básicamente se debe a las condiciones en las que se está desarrollando. Por ejemplo, *Lactobacillus sanfranciscensis*, por efecto de la presencia de pequeñas cantidades de oxígeno disueltas en el medio de crecimiento (Stolz y col. 1993). En *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 se cree que es debido a que el oxígeno actúa como aceptor de electrones (Calderón y col. 2001) o por la limitación o agotamiento de algunos factores de crecimiento (Wang y col. 1979) o a la cinética de la fermentación del producto (por ejemplo la producción de acetato durante el primer paso del crecimiento).

Durante el crecimiento de *S. bovis* A12203, el comienzo de la segunda fase exponencial coincide con el punto en el cual la concentración de azúcares reductores alcanza la mayor concentración. En este estudio no se ahondó en las causas por las cuales este microorganismo presenta tal comportamiento, pero definitivamente tanto la temperatura (40°C) como el pH (8.5) acentuaron la presencia de este patrón de crecimiento, ya que durante las fermentaciones anteriormente descritas no se observó tal efecto.

Los valores de actividad amilolítica y la velocidad específica de producción de amilasa fueron los más pequeños que se encontraron durante la caracterización de esta cepa, sin embargo el rendimiento de amilasa relativo a biomasa fue aun mejor que el obtenido de las fermentaciones a realizadas a valores de pH de 6.5 y 8.5 (ambas incubadas a 30°C), pero mucho menor que el obtenido de las fermentaciones a 37 y 40°C (Tabla 6).

De esta fermentación se esperaban mayores velocidades de crecimiento y mejores rendimientos que los encontrados en las fermentaciones anteriores y a pesar de que no fue así como sucedió, se encontraron resultados en los que será necesario profundizar para comprender.

### 7.3 Fermentación del almidón por *S. macedonicus* A45201

#### Influencia del pH y de la temperatura sobre su crecimiento y la actividad amilolítica

##### ▲ Influencia del pH

Para determinar la influencia del pH sobre el crecimiento y actividad amilolítica de *S. macedonicus* A45201 se analizaron los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas a un pH inicial de: 4.5, 6.5 y 8.5, todas incubadas a 30°C.

Al igual que *S. bovis* A12203, *S. macedonicus* A45201 fue capaz de crecer solo durante las fermentaciones a pH inicial de 6.5 y 8.5, mientras que a un valor de pH de 4.5 no se observó el desarrollo de los microorganismos antes mencionados.

Aunque no se encontró información acerca del comportamiento de *Streptococcus macedonicus* en presencia de almidón, es sabido que el crecimiento de las bacterias del género *Streptococcus* en medios líquidos puede ser inhibido por el descenso del pH (Hardie y col. 1986).

En los medios ajustados a pH 6.5 y 8.5 (ambos incubados a 30°C), se presentaron diferencias en el crecimiento de esta cepa a lo largo del periodo de incubación. En la fermentación a pH 6.5, el microorganismo solo requirió de 1.5 horas para llegar a la fase exponencial de crecimiento, mientras que en la fermentación a pH 8.5 se necesitó del doble de tiempo. Fue en la primera, en la que se determinó la mayor velocidad específica de crecimiento (Tabla 7). Cabe destacar que durante la caracterización de este microorganismo la menor velocidad específica de crecimiento se observó en la fermentación realizada a pH 8.5.

Al medir la actividad amilolítica de la enzima en estas fermentaciones (pH 6.5 y 8.5), se encontró que en la séptima hora (cuando el pH de los medios era de 5.3 y 7.7 respectivamente) el valor de actividad fue el mismo, sin embargo después de este tiempo las diferencias se hicieron evidentes, ya que en la fermentación a pH 6.5 la actividad se mantuvo constante y disminuyó alrededor de las onceava hora, mientras que en la realizada a pH 8.5 la actividad continuó incrementándose hasta alcanzar su valor máximo en la doceava hora, mismo que mantuvo hasta las 24 horas.

Fue también bajo esta condición de crecimiento (pH 8.5 a 30°C), que el microorganismo logró mantener una actividad amilolítica considerable hasta el final de la fermentación y se obtuvo el mayor rendimiento de amilasa con respecto a biomasa. Estos resultados indican que el crecimiento de *S. macedonicus* A45201 es favorecido cuando se expone a medios ajustados a pH 6.5, mientras que la actividad amilolítica se incrementa y se mantiene por más tiempo cuando el microorganismo se encuentra en un medio a pH de 8.5.

Aunque al final de las fermentaciones el pH de los medios era prácticamente igual (4.8), en la fermentación a pH 8.5 el descenso del pH ocurrió más lentamente, por lo que la actividad amilolítica no fue afectada tan rápidamente por la acidez del medio.

No se observaron grandes diferencias en el porcentaje de carbohidratos utilizados por el microorganismo ni en la cantidad de almidón hidrolizado durante las fermentaciones a valores de pH 8.5 y 6.5. En ambas fermentaciones se presentó una acumulación importante de azúcares reductores alrededor de la octava hora, pero la que se produjo en la fermentación a pH 6.5 fue ligeramente mayor. Estos azúcares disminuyeron gradualmente hasta las 12 horas, tiempo después del cual se mantuvieron constantes hasta las 26 h horas.

*S. macedonicus* A45201 al igual que *S. bovis* A12203 y algunas bacterias del género *Lactobacillus* tal como *Lactobacillus fermentum* presentaron una acumulación temporal de azúcares reductores (Calderón y col. 2001) cuando crecieron en almidón a 30°C.

### ▲ Influencia de la temperatura

Con los resultados obtenidos de las fermentaciones realizadas a 30, 37 y 40°C (a pH inicial de 6.5), se determinó el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *S. macedonicus* A45201 y sobre la actividad de la amilasa que produce (tabla 7).

El aumento en la temperatura de incubación de 30 a 37°C no afectó la velocidad específica de crecimiento del microorganismo, ya que los valores que se obtuvieron fueron muy semejantes (1.52 y 1.56 hr<sup>-1</sup> respectivamente). Al incubar el microorganismo a 40°C, este parámetro aumentó considerablemente, de tal manera que fue el valor más alto que se registró durante la caracterización de esta cepa (2.19 hr<sup>-1</sup>). Lo descrito previamente coincide con un estudio de Tsakalidou y col. (1998) en el que reportaron que el crecimiento de *S. macedonicus* en caldo M17 (oxid) es minimizado cuando se incuba a 30°C, pero favorecido a altas temperaturas (37 y 42°C).

A 30°C se observó la menor actividad amilolítica, a 37°C el valor más alto de actividad se presentó en la sexta hora de fermentación y no logró mantenerse por mucho tiempo, mientras que en la fermentación a 40°C solo se requirieron 5 horas para alcanzar el mismo valor de actividad. En esta última fermentación la actividad se mantuvo casi constante hasta las 8 horas y tanto la velocidad específica de producción de amilasa como el rendimiento de producción de la enzima fueron más altos que los observados en las fermentaciones a 30 y 37°C (figuras 11, 12 y 14).

A pesar de que las fermentaciones a 37 y 40°C mostraron valores de actividad amilolítica muy parecidos, 697 U/L (en la sexta hora) y 695 U/L (en la quinta hora) respectivamente, es posible que la rápida acidificación del medio en la fermentación a 37°C evitó que la actividad se mantuviera por más tiempo, también fue en esta que se observó el pH más bajo durante la sexta hora de fermentación (Tabla 7).

La acumulación más alta de azúcares reductores coincidió con el periodo de tiempo en el cual se presentaron los valores de actividad amilolítica máximos, tanto en la fermentación a 37 como a 40°C. El porcentaje de almidón hidrolizado fue de 60% en todos los casos.

### ▲ Fermentación en condiciones óptimas de temperatura y pH

De acuerdo con lo anteriormente descrito, es evidente que el crecimiento de *S. macedonicus* A45201 es favorecido a altas temperaturas, es decir a 40°C, mientras que mantiene a valores altos de actividad amilolítica por un mayor periodo de tiempo cuando el microorganismo es expuesto a valores de pH básico (8.5).

Con el objeto de optimizar aun más el desarrollo de la cepa así como la actividad de la enzima, se decidió realizar una fermentación combinando el pH y la temperatura arriba mencionadas, es decir a pH inicial de 8.5 y una temperatura de incubación de 40°C.

Aunque se suponía que estas serían las condiciones óptimas para la cepa, la respuesta del microorganismo a este pH y temperatura de incubación fueron: la formación de un polisacárido de aspecto blanco y viscoso inmerso en el medio de cultivo, un decremento gradual de la DO<sub>600nm</sub>, la lenta disminución del pH hasta un valor de 8.1 y la hidrólisis del 60% del sustrato a las 24 horas de fermentación. Es probable que estas condiciones de fermentación hayan generado un ambiente de estrés para la cepa, lo que la condujo a la producción de un polisacárido (EPS), pues se sabe que una de las funciones de éste es proteger a la célula de condiciones desfavorables (Leigh y Walter, 1994).

*S. macedonicus* es productor de EPS cuando se expone a condiciones de estrés. De hecho es común que algunas bacterias lácticas como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus helveticus* produzcan exopolisacáridos (Jolly y col. 2001).

Factores físicos (temperatura de incubación, el pH y la velocidad de agitación) y químicos (fuente de carbohidratos y de nitrógeno, presencia o ausencia de otros componentes del medio como sales y vitaminas) pueden desencadenar la generación de exopolisacáridos (EPS) (Degeest y col. 1998). Además, las condiciones para la producción de EPS son altamente variables y dependen también de la cepa con la que se trabaje, por ejemplo para *S. thermophilus* un pH de 5.5 y una temperatura de incubación de 40°C son condiciones óptimas (Zisu y col. 2003).

Uno de los indicadores de la mala calidad del pozol para los productores y consumidores es la formación de “hilos”, debido a la presencia de bacterias lácticas productoras de polímero de los géneros *Leuconostoc*, *Lactobacillus* y *Lactococcus* (Cañas y col. 1993), sin embargo, actualmente en la industria láctea el EPS microbiano de ciertas bacterias lácticas es usado para mejorar la textura de alimentos lácteos fermentados como el yogurt y el queso (Jolly y col. 2001).

## 7.4 Comparación de las cepas

### ▲ *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201

Durante este estudio se encontraron similitudes y diferencias en el comportamiento de las cepas al ser expuestas a diferentes valores de pH y temperaturas de incubación.

El desarrollo de las cepas se inhibió a valores de pH ácido (aproximadamente 5). Tal vez sea por eso que la concentración de bacterias lácticas amilolíticas disminuye a medida que la acidificación del pozol aumenta.

La exposición de ambos microorganismos a un pH de 8.5 permitió aumentar la velocidad específica de producción de amilasa y mejoró el rendimiento de amilasa relativo a la biomasa. También estos parámetros fueron más altos para *S. macedonicus* A45201, que los encontrados para *S. bovis* A 12203 (Tabla 7 y 6).

El crecimiento de ambas cepas fue favorecido a medida que se incrementó la temperatura de incubación y aunque *S. macedonicus* A45201 mostró velocidades específicas de crecimiento más altas que *S. bovis* A 12203, esta última parece ser mucho más sensible al cambio de temperatura, ya que las diferencias entre sus valores de velocidad específica de crecimiento son más evidentes (Tablas 6 y 7).

Aunque las fermentaciones realizadas a 40°C y a un pH de 8.5 no fueron las condiciones óptimas para el crecimiento de las cepas y para la producción de sus enzimas, sí nos permitieron observar el comportamiento de las cepas al encontrarse bajo este tipo de condiciones. *S. macedonicus* A 45201 es un microorganismo mucho más sensible al estrés que *S. bovis* A12203, pues el primero produjo un polisacárido en el medio de cultivo como

reacción a las condiciones de crecimiento mientras que el último creció en esas condiciones observándose un patrón bifásico de crecimiento.

▲ *S. bovis* A12203, *S. macedonicus* A45201 y *S. bovis* 25124 durante la fermentación de almidón a pH inicial de 6.5 y 30°C

La Tabla 8 contiene los parámetros cinéticos obtenidos de las fermentaciones del almidón a pH inicial de 6.5 y 30°C de *S. bovis* A12203, *S. macedonicus* A45201 (obtenidos en este trabajo) y *S. bovis* 25124 (publicados por Díaz y col. 2003).

Tanto las cepa *S. bovis* A12203 como la 25124 fueron aisladas del pozol, sin embargo, se pudo observar que esta última presentó valores más altos en la velocidad específica de crecimiento y en el rendimiento de amilasa relativo a biomasa, mientras que la velocidad específica de producción de amilasa resulto ser mayor para la cepa A12203.

Al comparar las tres cepas, se mostró que *S. macedonicus* A45201 tuvo los valores más altos de velocidad específica de crecimiento, rendimiento de amilasa relativo a biomasa y velocidad específica de producción de amilasa.

Aunque las cepas evaluadas en este y en un estudio previo pertenecen al mismo género o especie, como en el caso de las cepas A12203 y 25124, es posible que pequeñas diferencias en su genoma, como las que se aprecian en el dendrograma de la ribotipificación (figura 1), influyan en la sensibilidad de cada cepa cuando se encuentra bajo diferentes condiciones de crecimiento como el pH y la temperatura.

**Tabla 8. Parámetros cinéticos de *S. bovis* A45201, *S. bovis* 25124 y *S. macedonicus* A45201, obtenidos de la fermentación de almidón a pH inicial de 6.5 y 30°C**

Parámetros cinéticos	pH 6.5, 30°C		
	<i>S. bovis</i> A12203	<i>S. macedonicus</i> A45201	<i>S. bovis</i> 25124*
$\mu$ (hr <sup>-1</sup> )	0.53	1.52	0.94
$Y_{amy/x}$ (U g <sup>-1</sup> )	328	130	139
$q_{amy}$ [U(g células peso seco) <sup>-1</sup> hr <sup>-1</sup> ]	174	198	130

$\mu_{max}$  (velocidad específica de crecimiento),  $Y_{amy/x}$  (rendimiento de amilasa con respecto a la biomasa),  $q_{amy}$  (velocidad específica de producción de amilasa),

\*Resultados reportados por Díaz y col. 2003

## CAPITULO VIII. CONCLUSIONES

- ❖ La mayor actividad amilolítica de las cepas *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201 se encuentra asociada a la célula.
- ❖ Las cepas aisladas del pozol, *S. bovis* A12203 y *S. macedonicus* A45201 no crecen en almidón cuando el pH de los medios es de 4.5. El crecimiento de ambas cepas se favorece a pH 6.5 y 8.5 (sensibilidad a bajos valores de pH).
- ❖ El efecto de la temperatura en el crecimiento de ambas cepas fue claro, a medida que la temperatura de incubación aumentó también aumentó la velocidad específica de crecimiento, el rendimiento de amilasa con respecto a la biomasa y la velocidad específica de producción de amilasa.
- ❖ *S. macedonicus* A45201 presentó velocidades de crecimiento más altas que *S. bovis* A12203, sin embargo este último presentó mayor actividad amilolítica.
- ❖ La mayor velocidad específica de crecimiento, velocidad de producción de amilasa y rendimiento de amilasa relativo a biomasa de ambas cepas se presentaron durante la fermentación a pH 6.5 y 40°C.
- ❖ Existen diferencias en el crecimiento en MRS-almidón entre las cepas *S. bovis* A12203, *S. macedonicus* A45201 y *S. bovis* 25124
- ❖ Aunque pertenecen al mismo género (*S. bovis*, *S. macedonicus*) e inclusive a la misma especie (*S. bovis* A12203 y *S. bovis* 25124), estas cepas mostraron diferencias en el patrón de ribotipificación (Díaz-Ruiz et al., 2003). Estas diferencias entre las cepas se ven reflejadas en las diferencias en sus patrones de fermentación y parámetros cinéticos en las diferentes condiciones estudiadas

## CAPITULO IX. REFERENCIAS

- ❖ **Agati V., J. P. Guyot J. Morlon-Guyot, P Talamond y D. J. Hounhouigan.** 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. *J. Appl. Microbiol.* **85**: 512-520.
- ❖ **Aguilar G., J. Morlon-Guyot, B. Trejo-Aguilar, J. P. Guyot.** 2000. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase produced by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup>, an amylolytic lactic acid bacterium. *Enzyme and Microbial Technol.* **27**: 406-413.
- ❖ **Ampe F., N. ben Omar y J. P. Guyot.** 1999. Culture independent quantification of physiologically active microbial groups in Mexican pozol, a lactic acid fermented dough, using rRNA-target oligonucleotide probes. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 131-140.
- ❖ **Badui D.** 1993. Química de Alimentos, Tercera edición. Ed. Alhambra Mexicana, México D. F., p. 281-324.
- ❖ **Bolaños S.** 2004. Variabilidad en la microbiota de diferentes muestras de pozol, determinada mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE). Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, 111 pp.
- ❖ **Boyer C. D. y J. C. Shannon.** 1987. Carbohydrates of the kernel, p. 253-272. En: S. A. Watson and P. E. Ramstad (ed.), Corn: Chemistry and Technology. The American Association of Cereal Chemist Inc, St. Paul, Minnesota U. S. A.
- ❖ **Calderon M., G. Loiseau y J. P. Guyot.** 2001. Nutritional requeriments and simplified cultivation medium to study growth and energetics of a sourdough

- lactic acid bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 during heterolactic fermentation of starch. *J. Appl. Microbiol.* **90**: 508-516.
- ❖ **Cañas A. O., E. Barzana, J.D. Owens y M. C. Wachter.** 1993. La elaboración del pozol en los altos de Chiapas. *Ciencia.* **44**: 219-229.
  - ❖ **Cerning, J., Marshall, V.M.,** 1999. Exopolisaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Rec. Res. Dev. Microbiol.* **3**: 195-209.
  - ❖ **Cheng P., R. E. Muller, S. Jaeger, R. Bajpai y E. L. Iannotti.** 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J. of Ind. Microbiol.* **7**: 27-34.
  - ❖ **Cotta M. A.** 1992. Interaction of ruminal bacteria in the production and utilization of maltooligosaccharides from starch. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 189-196.
  - ❖ **Cravioto R. O., Y. O. Cravioto, Massieve, H. G. y G. J. Guzmán.** 1955. El pozol, forma indígena de consumir el maíz en el sureste de México y su aporte de nutrientes a la dieta. *Cien. Mex.*, **15**: 27-30.
  - ❖ **De Vuyust, L., B. Degeest.** 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**: 153-177.
  - ❖ **Díaz R. G.** 2003. Fermentación de almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de Doctor en Ciencias (Bioquímicas). Facultad de Química, UNAM, México, 119 pp.
  - ❖ **Dubois, M., K.A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers y F. Smith.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350-356.

- ❖ **Escalante A., C. Wachter, F. Farres.** 2001. Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **64**: 21-31.
  
- ❖ **Fogarty W. M.** 1983. Microbial amylases, p. 1-34. En W. M. Fogarty (ed), Microbial enzymes and biotechnology. Applied Science Publisher, London.
  
- ❖ **Giraffa G.** 2003. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol. Reviews* xxx.
  
- ❖ **Giraud E. y G. Cuny.** 1997. Molecular characterization of  $\alpha$ -amylase genes of *Lactobacillus plantarum* A6 and *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010<sup>T</sup>. *J. Appl. Microbiol.* **88** (1): 176-182.
  
- ❖ **Gupta R., P. Gigras, H. Mahopatra, V.K. Goswami, B. Chauhan.** 2003. Microbial  $\alpha$ -amylases: biotechnological perspective. *Process Biochemistry.* **38**: 1539-1616.
  
- ❖ **Hardie J. M.** 1986. Genus *Streptococcus*, p. 1043-1046. En P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams Wilkins, Baltimore.
  
- ❖ **Hardie, J. M. y R. A. Whiley.** 1995. The genus *Streptococcus*, p. 55-124. En B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (ed.) The lactic acid bacteria. The genera of lactic acid bacteria, Vol. 2. Blackie Academic and professional. Bishopbriggs, Glaslow.
  
- ❖ **Holzapfel W. H.** 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food microbial.* **75**: 197-212.

- ❖ **Jarvis G.N., A. Kurtovic, A.G. Hay, J.B. Russell.** 2001. The physiological and genetic diversity of bovine *Streptococcus bovis* strains. *FEMS Microbiol. Ecology* 35: 49-56.
  
- ❖ **Millere, G. L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 31: 426-428.
  
- ❖ **Nuriada L., M. C Wacher. y J. D Owens,** 1995. Microbiology of pozol, a Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 567-571.
  
- ❖ **Olympia M., H. Fukuda, H. Ono, Y. Kaneko, y M. Takano.** 1995. Characterization of starch-hidrolizing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, "Burong Isda" and its amylolytic enzyme. *J. Ferment. Bioeng.* 80 (2): 124-130
  
- ❖ **Pandey A., P. Nigam, CR. Soccol, VT. D. Singh, R. Mohan.** 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31: 135-152.
  
- ❖ **Parés R. y A. Juárez.** 1997. Bioquímica de los microorganismos. Ed. Reverte, S. A. Barcelona, España.
  
- ❖ **Pirt S.J.** 1985. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
  
- ❖ **Rivera Noriega A.** 2001. Efecto de la acción de microorganismos amilolíticos en la fermentación del pozol. Tesis. Facultad de Química, UNAM, México, 62 pp.
  
- ❖ **Satoh E., T. Uchimura, T. Kudo y Komagata.** 1997. Purification, characterization and nucleotide sequence o fan intracellular maltotriose-producing

$\alpha$ -amylase from *Streptococcus bovis* 148. *Appl. Environ Microbiol.* **63** (12): 4941-4944

- ❖ **Vincent J. B., J. Faber, J. R. Neeser, F. Stinglele y P. Kamerling.** 2001. Structure and properties of exopolisaccharide produced by *Streptococcus macedonicus* Scl 136. *Glycobiology* **11**: 131-139
- ❖ **Ulloa M., T. Herrera.** An Inst. Biol. Universidad Nacional Autónoma de México (1976-1982). 47-53 Ser. Bot., 145-163.
- ❖ **Ulloa, M, T Herrera y P. Lappe.** 1987. Pozol. En: Fermentaciones tradicionales indígenas de México. Instituto Nacional Indigenista. **16**: 13-20.
- ❖ **Wacher M. C., A. Cañas, E. Barzana, P. Lappe, M. Ulloa y D. Owens.** 2000. Microbiology of indian and mestizo pozol fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 251-256.
- ❖ **Wacher M. C., A. Cañas, P. E. Cook, E. Barzana, J. D. Owens.** 1993. Sources of microorganism in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 269-274.
- ❖ **Wells J. E., D. O. Krause, T.R. Callaway y J. B. Russell.** 1997. A bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 237-243
- ❖ **Zisu B., N. P. Shah.** 2003. Effects of pH, Temperature, Supplementation with whey protein concentrate, and adjunct cultures on the production of exopolysaccharides by *streptococcus termophilus* 1275. *J. Dairy Sci.* **86**: 3405-3415.